

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Romana Weissová

Úloha mitochondrií v adaptaci na chronickou hypoxii u spontánně hypertenzních a
konplastických potkanů

The role of mitochondria in adaptation to chronic hypoxia in the spontaneously hypertensive
and conplastic rats

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 03.05.2013

Romana Weissová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli panu doc. RNDr. Martinu Kalousovi, CSc. za vedení mé práce a za čas, který mi věnoval. Dále děkuji paní doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. za cenné rady a připomínky a za poskytnutí zázemí její laboratoře. Ráda bych poděkovala celému kolektivu laboratoře, zejména Mgr. Martině Klevstigové a RNDr. Kristýně Holzerové za pomoc a příjemné pracovní prostředí. Děkuji rodině a blízkým za neustálou podporu.

Tato práce byla vypracována v Laboratoři buněčné signalizace v myokardu na Katedře buněčné biologie. Práce byla finančně zajištěna grantem GAČR 13-10267S.

Abstrakt

Adaptace na chronickou hypoxii má kardioprotektivní účinky. Molekulární mechanismus tohoto jevu není zatím zcela objasněn, je však prokázáno, že významnou úlohu v ochraně srdeční tkáně mají mitochondrie. V této diplomové práci byl zkoumán vliv adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii (CNH; 10 % O₂, 21 dní) na spontánně hypertenzní potkany (SHR) a od nich odvozený konplastický kmen, který má jaderný genom kmene SHR a mitochondriální genom kmene Brown Norway (BN). V homogenátu srdeční svaloviny normoxických a adaptovaných jedinců byly stanoveny enzymové aktivity malátdehydrogenázy (MDH), citrátsyntázy (CS), NADH-cytochrom c oxidoreduktázy, sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy a cytochromoxidázy (COX). Metodou Western blotu bylo stanoveno množství antioxidantních enzymů manganové a měď-zinkové superoxiddismutázy (MnSOD, Cu/ZnSOD), katalázy a vybraných podjednotek komplexů oxidační fosforylace (Ndufa9, Sdha, Uqcrc2, COX-4, MTCO1, Atp5a1). Konplastický kmen se od kmene SHR liší za normoxických podmínek pouze nižším množstvím podjednotky MTCO1 komplexu IV oxidační fosforylace. Podjednotka MTCO1 je kódovaná mitochondriální DNA a je produktem jednoho ze sedmi protein-kódujících genů, kterými se od sebe liší SHR a konplastický kmen. Po hypoxické adaptaci se zvyšuje množství katalázy a snižuje se množství podjednotek komplexu IV u obou kmenů. U SHR dochází po adaptaci na CNH navíc k poklesu aktivity MDH a snížení obsahu Cu/ZnSOD. Pozorované změny vedou k významným rozdílům mezi konplastickým kmenem a kmenem SHR po adaptaci na CNH. Adaptovaní potkani konplastického kmene vykazují vyšší aktivitu MDH, nižší obsah katalázy, vyšší množství proteinu podjednotky Ndufa9 komplexu I a nižší obsah podjednotek COX-4 a MTCO1 komplexu IV než adaptovaní potkani SHR. Zdá se tedy, že mitochondriální genom má vliv na některé aspekty odpovědi srdečního svalu na adaptaci na CNH.

Klíčová slova: spontánně hypertenzní potkani, konplastický kmen, mitochondrie, kontinuální normobarická hypoxie, oxidační fosforylace, antioxidantní enzymy, Krebsův cyklus

Abstract

Adaptation to chronic hypoxia provides cardioprotective effects. Molecular mechanism of this phenomenon is not yet completely understood, but it is known that cardiac mitochondria play an essential role in induction of protective effects. The purpose of this diploma thesis is to study effects of continuous normobaric hypoxia (CNH; 10 % O₂, 21 days) on spontaneously hypertensive rats (SHR) and conplastic strain that is derived from SHR. These animals have nuclear genome of SHR strain and mitochondrial genome of Brown Norway (BN) strain. Cardiac homogenate was used to measure enzymatic activity of malate dehydrogenase (MDH), citrate synthase (CS), NADH-cytochrome c oxidoreductase, succinate-cytochrome c oxidoreductase and cytochrome oxidase (COX). Using Western blot procedure the protein amount of antioxidant enzymes was measured – manganese superoxide dismutase and copper-zinc superoxide dismutase (MnSOD, Cu/ZnSOD), catalase and chosen subunits of oxidative phosphorylation complexes (Ndufa9, Sdha, Uqcrc2, COX-4, MTCO1, Atp5a1). Under normoxic conditions the conplastic strain has lower amount of complex IV subunit MTCO1 in comparison with SHR. This subunit is encoded by mitochondrial DNA and it is one of the seven protein-coding genes in conplastic strain that differ from SHR. Adaptation to hypoxia causes an increase of catalase content and decreased content of complex IV subunits in both strains. Chronically hypoxic SHR exhibit also the decrease in MDH activity and Cu/ZnSOD content. This changes result in significant differences between SHR and conplastic strain after adaptation to CNH. Hypoxia-adapted conplastic rats show higher MDH activity, lower amount of catalase, higher amount of Ndufa9 subunit of complex I and lower amount of subunits COX-4 and MTCO1 of complex IV when compared with adapted SHR. Mitochondrial genome clearly affects some aspects of the response of cardiac muscle to adaptation to CNH.

Keywords: spontaneously hypertensive rats, conplastic strain, mitochondria, continuous normobaric hypoxia, oxidative phosphorylation, antioxidant enzymes, Krebs cycle

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD.....	11
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1 MITOCHONDRIE V SRDCI.....	12
2.1.1 Energetický metabolismus v srdečních buňkách.....	13
2.1.1.1 <i>Krebsův cyklus</i>	15
2.1.1.2 <i>Oxidační fosforylace</i>	16
2.1.2 Reaktivní kyslíkové molekuly a oxidační stres	18
2.1.3 Antioxidační enzymy.....	21
2.1.4 Mitochondriální genom	23
2.2 SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍ POTKANI (SHR)	25
2.2.1 SHR mitochondrie	27
2.2.2 Energetický metabolismus u SHR.....	28
2.2.2.1 <i>Krebsův cyklus</i>	29
2.2.2.2 <i>Oxidační fosforylace</i>	29
2.2.3 Antioxidační systém u SHR	30
2.3 KONPLASTICKÝ KMEN	30
2.3.1 Srovnání kmenů SHR a BN (Brown Norway)	31
2.3.2 Konplastický kmen SHR-mt ^{BN}	31
2.4 ADAPTACE NA CHRONICKOU HYPOXII.....	33
2.4.1 Změny metabolismu v důsledku adaptace na chronickou hypoxii.....	35
2.4.2 Molekulární mechanismus a úloha mitochondrií v kardioprotekci vyvolané adaptací na chronickou hypoxii.....	38
2.4.3 Kontinuální normobarická hypoxie	39
2.4.4 Adaptace na chronickou hypoxii u SHR	40
2.4.5 Adaptace na chronickou hypoxii u SHR-mt ^{BN}	40
3 CÍLE PRÁCE	42
4 MATERIÁL A METODY.....	43
4.1 MATERIÁL	43
4.1.1 Chemikálie.....	43
4.1.2 Laboratorní zvířata	43

4.1.2.1	<i>Experimentální model kontinuální normobarické hypoxie</i>	44
4.1.2.2	<i>Odběr tkáně</i>	44
4.2	METODY	45
4.2.1	Homogenizace tkáně	45
4.2.2	Stanovení koncentrace proteinů	45
4.2.3	Spektrofotometrické měření enzymových aktivit	46
4.2.3.1	<i>Malátdehydrogenáza</i>	46
4.2.3.2	<i>NADH-cytochrom c oxidoreduktáza a sukcinát-cytochrom c oxidoreduktáza</i>	47
4.2.3.3	<i>Citrátsyntáza</i>	48
4.2.4	Měření spotřeby kyslíku	49
4.2.4.1	<i>Stanovení aktivity cytochrom c oxidázy</i>	49
4.2.5	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)	50
4.2.5.1	<i>Příprava gelů</i>	50
4.2.5.2	<i>Příprava vzorků pro SDS-PAGE</i>	51
4.2.5.3	<i>Elektroforéza</i>	51
4.2.6	Western blot	53
4.2.7	Imunodetekce	53
4.2.8	Metoda zesílené chemiluminiscence (ECL)	54
4.2.9	Vyhodnocení signálu z filmů	55
4.2.10	Zpracování dat	56
5	VÝSLEDKY	57
5.1	HMOTNOSTNÍ PARAMETRY	57
5.2	AKTIVITY ENZYMŮ	58
5.2.1	Enzymy Krebsova cyklu	58
5.2.1.1	<i>Citrátsyntáza</i>	58
5.2.1.2	<i>Malátdehydrogenáza</i>	59
5.2.2	Enzymy oxidační fosforylace	60
5.2.2.1	<i>NADH-cytochrom c oxidoreduktáza</i>	61
5.2.2.2	<i>Sukcinát-cytochrom c oxidoreduktáza</i>	62
5.2.2.3	<i>Cytochrom c oxidáza</i>	63
5.3	MNOŽSTVÍ PROTEINU	64
5.3.1	Antioxidační enzymy	64
5.3.1.1	<i>MnSOD</i>	64

5.3.1.2	<i>Cu/ZnSOD</i>	66
5.3.1.3	<i>Kataláza</i>	68
5.3.2	Enzymy oxidační fosforylace	69
6	DISKUSE	75
6.1	EXPERIMENTÁLNÍ MODEL A ZVOLENÝ MATERIÁL	75
6.2	HMOTNOSTNÍ PARAMETRY	77
6.3	AKTIVITY ENZYMŮ KREBSOVA CYKLU	78
6.4	ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY	80
6.5	OXIDAČNÍ FOSFORYLACE.....	82
7	ZÁVĚR	86
8	SHRNUTÍ	87
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88

Seznam zkratk

ADP	adenosindifosfát
AP-1	aktivátorový protein-1
ATP	adenosintrifosfát
Atp5a1	ATP syntáza, H ⁺ transportující, mitochondriální F1 komplex, alfa podjednotka 1 (podjednotka komplexu V oxidační fosforylace)
BN	Brown Norway (kmen potkanů)
BNIP3	Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interagující protein 3
BPB	bromfenolová modř
BSA	hovězí sérový albumin
CNH	kontinuální normobarická hypoxie
CoA	koenzym A
COX	cytochrom c oxidáza
COX-4	cytochrom c oxidáza, podjednotka IV (podjednotka komplexu IV oxidační fosforylace)
COX-4-1	cytochrom c oxidáza, podjednotka IV, izoforma 1
COX-4-2	cytochrom c oxidáza, podjednotka IV, izoforma 2
CS	citrátsyntáza
Cu/ZnSOD	měď-zinková superoxiddismutáza
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ETC	elektron-transportní řetězec
ETF	elektrony-přenášející flavoprotein
ETF-QO	elektrony-přenášející flavoprotein-ubichinon oxidoreduktáza
F1	první generace potomků
F2	druhá generace potomků
FADH ₂	flavinadenindinukleotid
FeS	železo-sirný
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

GLUT	glukózový transportér
GPx	glutathionperoxidáza
GSH	redukováný glutathion
GSSG	oxidováný glutathion
GTP	guanosintrifosfát
HIF-1	hypoxií indukovaný transkripční faktor-1
HRP	křenová peroxidáza
IFM	intermyofibrilární mitochondrie
IHH	intermitentní hypobarická hypoxie
IMM	vnitřní mitochondriální membrána
IRI	ischemicko-reperfúzní poškození
K _{ATP}	ATP-senzitivní draslíkový kanál
LV	levá komora
MDH	malátdehydrogenáza
MnSOD	manganová superoxiddismutáza
MPTP	mitochondriální pór přechodné permeability
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MTCO1	cytochrom c oxidáza, podjednotka 1 (podjednotka komplexu IV oxidační fosforylace)
mtDNA	mitochondriální DNA
NAD ⁺	oxidováný nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukováný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
Ndufa9	NADH dehydrogenáza (ubichinon) 1 alfa subkomplex, 9 (podjednotka komplexu I oxidační fosforylace)
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
Total OXPHOS	směs protilátek proti podjednotkám oxidační fosforylace
PPARα	receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů alfa
Prx	peroxiredoxiny
RNS	reaktivní dusíkové molekuly
RONS	ROS a RNS (reaktivní kyslíkové a dusíkové molekuly)

ROS	reaktivní kyslíkové molekuly
rpm	otáčky za minutu
rRNA	ribozomální RNA
RV	pravá komora
Sdha	sukcinát dehydrogenáza, podjednotka A, flavoprotein (Fp) (podjednotka komplexu II oxidační fosforylace)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
S.E.M.	střední chyba průměru
SHR	spontánně hypertenzní potkani
SHR-mt ^{BN}	konplastický kmen potkanů odvozený od kmene SHR a BN
SOD	superoxiddismutázy
SSM	subsarkolemální mitochondrie
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminometan
tRNA	transferová RNA
TTBS	solný roztok pufovaný Tris s Tweenem-20
Uqcrc2	ubichinol-cytochrom c reduktáza, “core“ protein II (podjednotka komplexu III oxidační fosforylace)
WKY	Wistar Kyoto (kmen potkanů)

1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění přispívají do značné míry k úmrtnosti ve vyspělých zemích. Jedná se zejména o ischemickou chorobu srdeční, během které dochází k omezení průtoku krve srdečním svalem a tedy k jeho omezenému okysličení. To vede k poškození srdečního svalu, neboť funkce srdečních buněk, které zabezpečují kontraktilní funkci srdce, je vysoce závislá na kyslíku. Adaptace na chronickou hypoxii, tedy stav omezeného přísunu kyslíku, se ukázala jako jedna z možností jak zvýšit odolnost srdečního svalu k akutnímu nedostatku kyslíku. Molekulární mechanismy způsobující protektivní účinky adaptace na chronickou hypoxii však dosud nejsou zcela známy. Významnou roli zde hrají mitochondrie, které jsou energetickým centrem buňky a současně hlavním místem produkce reaktivních kyslíkových molekul (ROS). Mitochondrie mají vlastní genom a otázkou je, do jaké míry může být mitochondriálním genomem ovlivněna adaptace na chronickou hypoxii. Mitochondriální genom totiž kóduje některé podjednotky komplexů oxidační fosforylace, která je na jedné straně nejvýznamnějším producentem energie v buňce, zároveň však vytváří také ROS. Ty v nízkých koncentracích slouží jako signální molekuly a patrně se účastní také navození kardioprotektivního účinku adaptace na chronickou hypoxii.

Konplastické kmeny, tedy kmeny nesoucí mitochondriální genom jednoho kmene na pozadí jaderného genomu kmene jiného, přinášejí nový přístup ke studiu úlohy mitochondrií za různých podmínek. Vzhledem k tomu, že se v lidské populaci nepříbuzní jedinci liší přibližně 50 nukleotidy mitochondriální DNA, je výzkum vlivu mitochondriálního genomu zajímavý a potenciálně prospěšný. Zkoumání vlivu mitochondriálního genomu na adaptaci na chronickou hypoxii a porozumění buněčným procesům doprovázejícím vývoj kardioprotekce může v budoucnu vést k praktickému využití např. v podobě cíleného terapeutického zásahu.

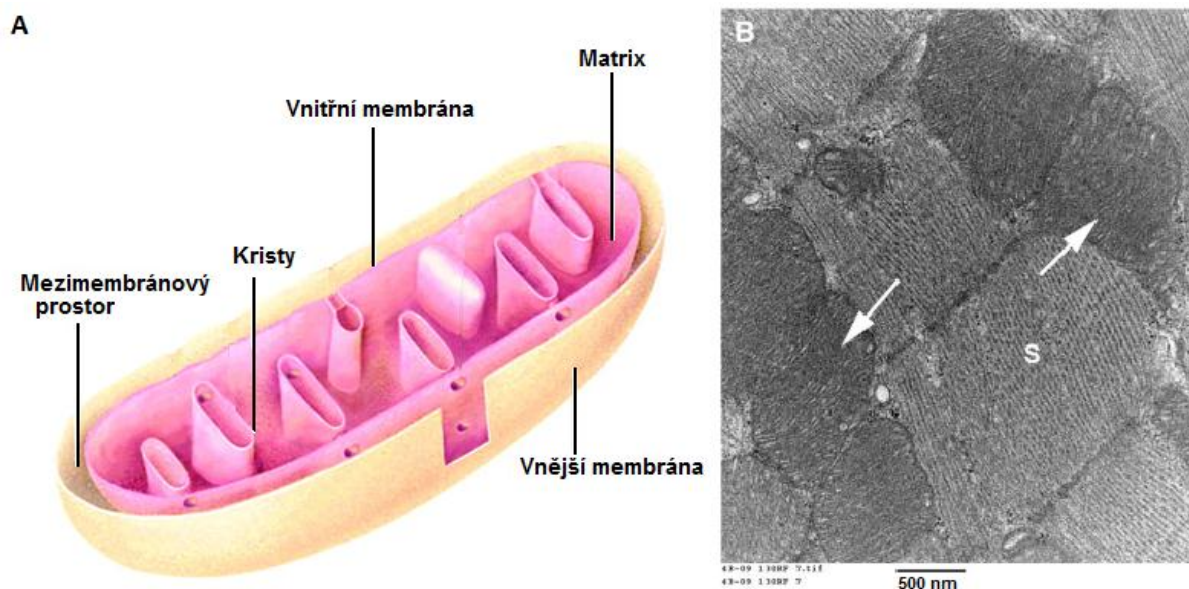
Mým úkolem bylo charakterizovat konplastický kmen odvozený od spontánně hypertenzních potkanů s ohledem na oxidační fosforylaci, antioxidační enzymy a enzymy Krebsova cyklu. Zároveň byly tyto parametry porovnány mezi potkany chovanými v normoxických podmínkách a potkany adaptovanými na kontinuální normobarickou hypoxii, u níž byl prokázán kardioprotektivní efekt.

2 Literární přehled

2.1 Mitochondrie v srdci

Srdce je životně důležitý orgán umožňující oběh krve a spolu s ním rozvod živin a kyslíku a odvádění odpadních látek. Funkce srdečních buněk, kardiomyocytů, je vysoce energeticky náročná, 30-40 % jejich objemu proto představují mitochondrie, jejichž hlavní úloha spočívá v produkci energie. V srdečních buňkách jsou mitochondrie organizovány pod plazmatickou membránou nebo mezi myofibrilami, které se skládají z aktinových a myozinových vláken a tvoří kontraktilní aparát buňky (obrázek 2.1 B). Takové uspořádání mitochondrií vede ke snadnějšímu a rychlejšímu přesunu ATP z místa produkce do místa jeho hlavní spotřeby (Jafri et al., 2001; Lukyanenko et al., 2009).

Mitochondrie jsou semiautonomní organely eukaryotních buněk a jsou dle endosymbiotické teorie pozůstatkem symbiotických bakterií. Mitochondrie jsou tvořeny dvěma membránami. Vnitřní mitochondriální membrána (IMM) vymezuje mitochondriální matrix, zatímco vnější odděluje vlastní mitochondrie od cytoplazmatického prostoru. Mezi vnitřní a vnější membránou se nachází tzv. mezimembránový prostor (obrázek 2.1 A). Vnější membrána obsahuje protein porin, a je tudíž na rozdíl od IMM propustná pro ionty a molekuly do 5 kDa. IMM je propustná velmi málo a pro přenos substrátů využívá specifické přenašeče. IMM je z velké části tvořena proteiny, a to zejména proteiny komplexů oxidační fosforylace. Povrch IMM je velký díky zprohýbání a vytvoření útvarů označovaných jako kristy. Mitochondrie bývají popisovány jako oválné organely velikosti bakterie. Jejich tvar a velikost jsou však velmi dynamické parametry, neboť mitochondrie spolu neustále splývají a opět se rozdělují. Mitochondrie mají svou vlastní DNA (mitochondriální DNA - mtDNA) a také vlastní aparát pro její expresi. Hlavní funkcí mitochondrií je produkce energie. Účastní se však i mnoha jiných buněčných procesů jako je signalizace, buněčná diferenciaci, buněčná smrt či udržování homeostázy vápníku (Logan, 2006).

Obrázek 2.1 - Struktura mitochondrií a jejich umístění v kardiomyocytu

Obrázek A schematicky znázorňuje strukturu mitochondrií. Vnitřní membrána (růžová) ohraničuje mitochondriální matrix a je uspořádána do struktur označovaných jako kristy. Vnější membrána (žlutá) odděluje mitochondrii od cytoplazmy. Mezi vnější a vnitřní membránou se nachází mezimembránový prostor. Obrázek B představuje elektronoptický snímek řezu myšního srdce. Bílé šipky označují mitochondrie natěsnané mezi sarkomery (S) tvořící jednotlivé myofibrily. (převzato a upraveno z Logan, 2006; Payne, 2011)

2.1.1 Energetický metabolismus v srdečních buňkách

Hlavním místem produkce ATP, tedy energetického “platidla“, je oxidační fosforylace probíhající na IMM mitochondrií. Za normálních podmínek je téměř veškeré ATP v srdci produkováno procesem oxidační fosforylace (>95 %), zbytek vzniká během glykolýzy a v Krebsově cyklu na substrátové úrovni. Donorem elektronů pro proces oxidační fosforylace jsou redukované koenzymy (NADH - nikotinamidadenin dinukleotid, FADH_2 – flavinadenin dinukleotid) vznikající jako produkt oxidace nutrientů, zejména cukrů a tuků. Hlavní metabolické dráhy produkující redukované koenzymy jsou beta-oxidace mastných kyselin, Krebsův cyklus a glykolýza (Stanley et al., 2005). IMM není propustná pro NADH. Cytosolické NADH se do mitochondrií dostává za pomoci několika reakcí, které spotřebovávají NADH v cytosolu za vzniku produktu, který je transportován přes IMM, a v matrix vedou k produkci NADH. Takový přenos je umožňován glycerol-fosfátovým nebo malát-aspartátovým kyvadlem, které je v srdečních buňkách převládajícím typem a sestává

z reakcí katalyzovaných malátdehydrogenázou (MDH) a aspartátaminotransferázou (Jafri et al., 2001; Safer, 1975).

Redukované koenzymy vstupují do elektron-transportního řetězce (ETC) spřaženého s oxidační fosforylací. Jeden mol NADH produkuje 2,5 molu ATP, zatímco 1 mol FADH_2 vede ke vzniku pouze 1,5 molu ATP. Důležitou úlohu v oxidační fosforylaci hraje adenin-nukleotidový translokátor, který přenáší ADP z cytosolu do mitochondrií výměnou za ATP, čímž poskytuje substrát pro mitochondriální ATP syntázu (Stanley et al., 2005).

Pro srdeční buňky jsou za běžných fyziologických podmínek hlavním substrátem mastné kyseliny, které jsou schopny pokrýt vysoké energetické nároky kardiomyocytů. Až 70 % ATP syntetizovaného srdečními buňkami pochází z mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Mastné kyseliny vstupují do kardiomyocytu prostou difuzí nebo pomocí přenašečů, z nichž nejvýznamnější v srdečních buňkách je translokáza mastných kyselin CD36. Oxidace mastných kyselin probíhá zejména v mitochondriích, méně v peroxizomech (Jafri et al., 2001; Stanley et al., 2005).

Vstup glukózy do buňky a jeho regulaci zajišťují glukózové transportéry (GLUT) na sarkolemě, z nichž nejvýznamnější pro kardiomyocyty je GLUT-4. Dalším zdrojem glukózy pro srdeční buňky je intracelulární zásoba glykogenu. V srdci je však glykogenu málo a má spíše tendenci k rychlému obratu namísto dlouhodobého skladování. Srdeční buňky využívají také ketolátky (beta-hydroxybutyrát, acetoacetát), které vznikají v játrech z mastných kyselin. Zdravé srdce spotřebovává také laktát, avšak např. během ischemie, kdy dochází k narušení oxidace pyruvátu a ke zvýšené glykolýze, srdce laktát produkuje (Jafri et al., 2001; Stanley et al., 2005).

Za běžných fyziologických podmínek jsou energetické potřeby plně pokryty produkcí energie ve formě ATP. Srdeční buňky obsahují poměrně malé množství ATP (5 $\mu\text{mol/g}$ mokré váhy), což spolu s vysokou rychlostí jeho hydrolýzy vede k tomu, že za běžných podmínek dojde ke kompletní obnově buněčného ATP každých 10 s. Dokonalé vyvážení dodávky a spotřeby ATP zajišťuje, že jeho koncentrace v srdeční buňce zůstává konstantní, a to i za výrazně zvýšeného výkonu. Tato rovnováha však může být porušena za některých patologických stavů, což vede k nedostatečné produkci energie s ohledem na energetické potřeby buněk (Jafri et al., 2001; Stanley et al., 2005).

2.1.1.1 Krebsův cyklus

Oxidace cukrů v glykolýze vede ke vzniku pyruvátu, který je enzymem pyruvátdehydrogenázou přeměněn na acetylkoenzym A (acetyl-CoA). Acetyl-CoA je současně i produktem beta-oxidace mastných kyselin a je molekulou, která vstupuje do Krebsova cyklu. Za normálních podmínek pochází 60-90 % acetyl-CoA v srdečních buňkách z oxidace mastných kyselin, zbývajících 10-40 % je produkováno oxidací pyruvátu pocházejícího z glykolýzy či oxidace laktátu (Stanley et al., 2005).

Krebsův cyklus (neboli cyklus trikarboxylových kyselin) je sledem osmi enzymatických reakcí, které vedou ke kompletní oxidaci acetyl-CoA na CO_2 . Reakce acetyl-CoA s oxalacetátem je katalyzována enzymem citrátsyntázou (CS) za vzniku citrátu. Citrát je přeměněn na izocitrát (katalyzováno akonitázou), který dá v další reakci vznik alfa-ketoglutarátu (katalyzováno izocitrátdehydrogenázou). V této reakci vzniká NADH a dochází k produkci 1 molekuly CO_2 . Alfa-ketoglutarátdehydrogenáza katalyzuje přeměnu alfa-ketoglutarátu a koenzymu A (CoA) na sukcinyl-CoA, NADH a CO_2 . Sukcinyl-CoA syntetáza následně katalyzuje přeměnu sukcinyl-CoA na sukcinát za současného uvolnění CoA a molekuly GTP. Sukcinát je dále přeměněn sukcinátdehydrogenázou na fumarát za vzniku FADH_2 . Sukcinátdehydrogenáza se zároveň účastní i oxidační fosforylace, kde tvoří komplex II. Fumaráthydratáza následně využije fumarát pro syntézu malátu, který je pomocí MDH přeměněn na oxalacetát za vzniku NADH. Oxalacetát vstupuje do dalšího cyklu reakcí (obrázek 2.2; Stanley et al., 2005).

Krebsův cyklus tedy produkuje 1 mol GTP, 3 moly NADH a 1 mol FADH_2 (na jeden mol acetyl-CoA). NADH a FADH_2 vznikající v Krebsově cyklu jsou následně využity při oxidační fosforylaci (Jafri et al., 2001).

Obrázek 2.2 - Schematické znázornění reakcí Krebsova cyklu

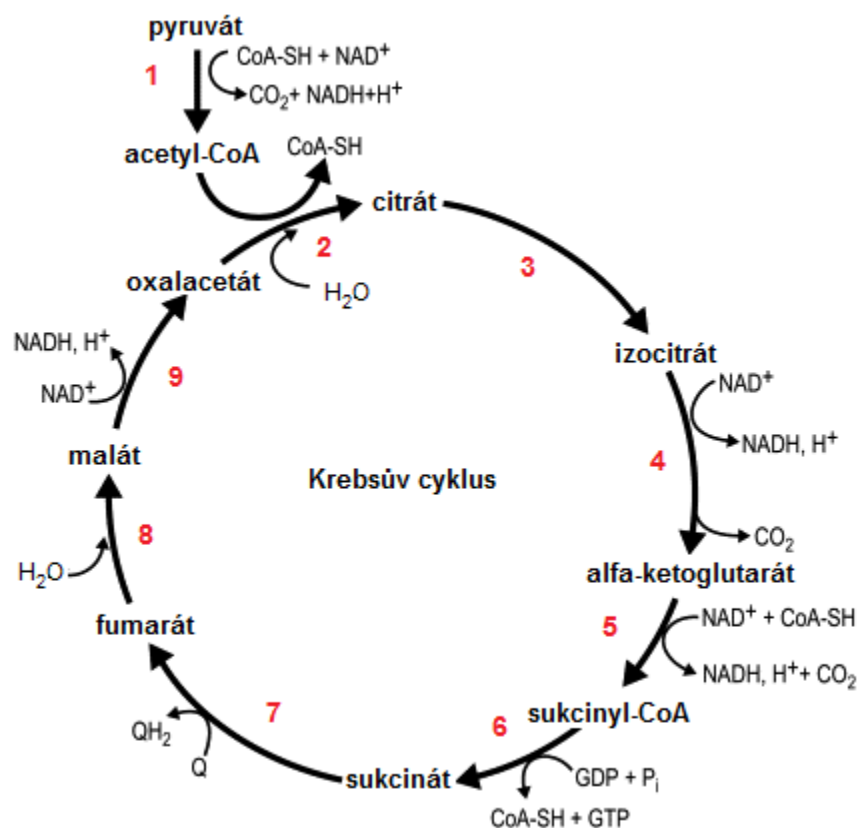


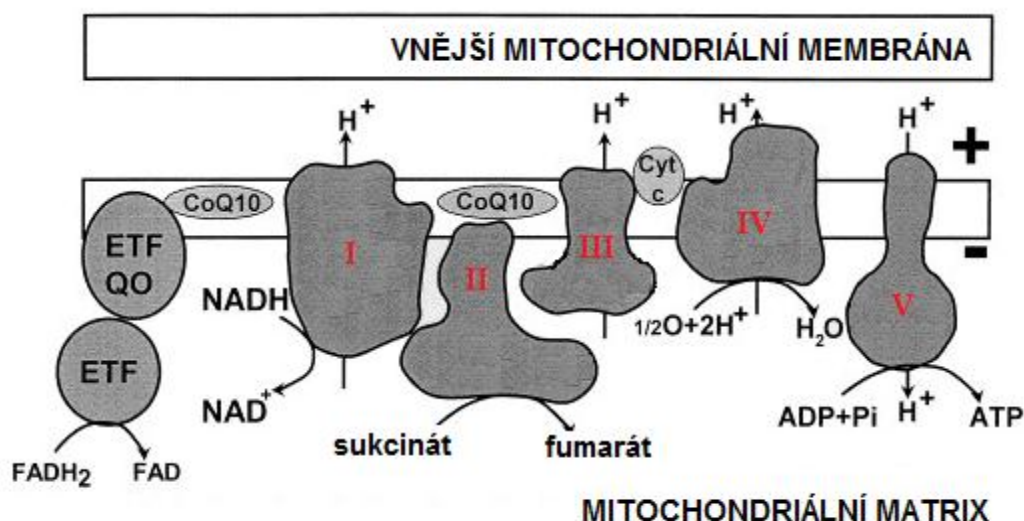
Schéma znázorňuje reakce Krebsova cyklu katalyzované enzymy: 1- pyruvátdehydrogenáza; 2 – citrátsyntáza; 3 – akonitáza; 4 – izocitrátdehydrogenáza; 5 – alfa-ketoglutarátdehydrogenáza; 6 - sukcinyl-CoA-syntetáza; 7 – sukcinátdehydrogenáza; 8 – fumaráthydratáza; 9 – malátdehydrogenáza. QH_2 – redukovaný koenzym Q; CoA – koenzym A; (převzato a upraveno z Amri and Abu-Asab, 2011)

2.1.1.2 Oxidační fosforylace

Oxidační fosforylace je souborem reakcí probíhajících na pěti proteinových komplexech lokalizovaných na IMM. Čtyři enzymové komplexy (oxidoreduktázy) ukotvené v IMM tvoří ETC, pátý komplex je tvořen vlastní ATP syntázou, která produkuje ATP. Energie produkovaná při oxidaci redukovaných koenzymů, tedy přenosem elektronů z NADH (či $FADH_2$) na kyslík, je uvolňována postupným přechodem přes enzymové komplexy a využita pro přesun protonů přes IMM, čímž vzniká elektrochemický gradient, který je posléze ATP syntázou využit pro vlastní fosforylaci - tvorbu ATP z ADP a fosfátu (Stanley et al., 2005).

Komplex I (NADH dehydrogenáza) se skládá u savců přibližně ze 43 podjednotek a jeho významnou součástí je flavinmononukleotid. Komplex I přijímá elektrony od NADH a dále je předává pomocí koenzymu Q (ubichinon), který volně difunduje v IMM, na komplex III. Komplex III (cytochrom bc₁) sestává z 11 proteinových komponent, z nichž nejvýznamnější jsou cytochrom b, Rieskeho protein (FeS protein typu Fe₂S₂) a cytochrom c₁. Součástí komplexu III je tzv. Q cyklus, který umožňuje přenos elektronů z koenzymu Q, který přenáší elektronový pár, na cytochrom c, který je schopen akceptovat pouze 1 elektron. Koenzym Q se váže do Q_o centra a jeden elektron vstupuje přes komplex III na cytochrom c, zatímco druhý elektron je předáván zpět na koenzym Q v centru Q_i. Meziproduktem tohoto přenosu je koenzym Q nesoucí pouze 1 elektron (ubisemichinon). Cytochrom c přenáší elektrony na komplex IV (cytochrom c oxidáza; COX), který se skládá ze 13 podjednotek a jeho součástí jsou 2 molekuly hemu a centra Cu_A a Cu_B obsahující atomy mědi. Na komplexu IV dochází k přenosu elektronů na konečný akceptor – kyslík. Elektrony pocházející z FADH₂ vstupují do řetězce přes komplex II (sukcinátdehydrogenáza), který je tvořen 4 podjednotkami a je zároveň enzymem účastnícím se Krebsova cyklu. Elektrony z jiných zdrojů, jako je oxidace mastných kyselin, mohou na koenzym Q vstupovat přes elektrony-přenášející flavoprotein (ETF) a elektrony-přenášející flavoprotein-ubichinon oxidoreduktázu (ETF-QO). Během průchodu ETC ztrácí elektrony svou volnou energii, která je využita pro tvorbu protonového gradientu na IMM. Tento gradient vzniká při průchodu elektronů komplexy I, III a IV, kdy dochází k přenosu protonů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Vzniklý elektrochemický gradient je následně využit komplexem V (ATP syntázou), jehož dvě hlavní části jsou membránová oblast Fo a do matrix zasahující oblast F₁. Průchod protonů po koncentračním gradientu z mezimembránového prostoru do matrix přes komplex V vede k produkci ATP tímto komplexem. Schéma znázorňující komplexy oxidační fosforylace je uvedeno na obrázku 2.3. Bylo ukázáno, že komplexy oxidační fosforylace tvoří supramolekulární útvary označované jako respirační superkomplexy či respirasomy (Smeitink et al., 2001; Winge, 2012).

Obrázek 2.3 - Schematické znázornění oxidační fosforylace



Komplexy oxidační fosforylace se nacházejí na vnitřní mitochondriální membráně. Komplex I (NADH dehydrogenáza) přijímá elektrony od NADH a předává je dále na koenzym Q (CoQ10), odkud se elektrony přesouvají na komplex III (cytochrom bc1). Z komplexu III jsou elektrony na komplex IV (cytochrom c oxidáza) přenášeny pomocí cytochromu c (Cyt c). Z komplexu IV jsou elektrony předávány na konečný akceptor, kterým je kyslík. Během průchodu elektronů přes komplexy I, III a IV dochází k přesunu protonů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru, čímž vzniká elektrochemický gradient. Tento je následně komplexem V (ATP syntáza) využit pro syntézu ATP z ADP a anorganického fosfátu (Pi). Alternativním místem vstupu elektronů je komplex II (sukcinátdehydrogenáza), který odebírá elektrony ze sukcinátu za vzniku fumarátu. Elektron je z komplexu II předán na koenzym Q a postupuje komplexy výše popsaným způsobem. Další možností je vstup na koenzym Q přes elektrony-přenášející flavoprotein (ETF) a elektrony-přenášející flavoprotein-ubichinon-oxidoreduktázu (ETF-QO). Plus a minus znázorňuje relativní membránový potenciál na vnitřní mitochondriální membráně. (převzato a upraveno z Longo, 2003)

2.1.2 Reaktivní kyslíkové molekuly a oxidační stres

Reaktivní kyslíkové molekuly (ROS) jsou reaktivní molekuly či radikály (částice s jedním nepárovým elektronem) odvozené od molekuly kyslíku (Turrens, 2003).

Za nejvýznamnější producenty ROS jsou označovány mitochondrie, kde vznikají ROS nejčastěji jako důsledek uvolnění elektronu z ETC. Jako další zdroje ROS jsou uváděny mitochondriální glycerolfosfátdehydrogenáza, alfa-ketoglutarátdehydrogenáza, xantinoxidáza, cyklooxygenáza, lipoxigenáza, syntáza oxidu dusnatého (NOS) či NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) oxidázy. Za dalšího mitochondriálního producenta ROS je považována monoaminoxidáza, která se nachází ve vnější mitochondriální membráně a

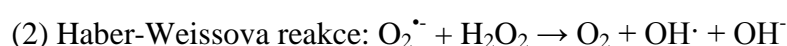
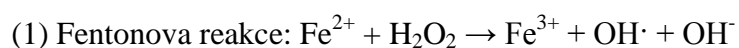
může produkovat peroxid vodíku (H_2O_2). ROS mohou vznikat také autooxidací malých molekul, jako jsou katecholaminy či flaviny (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006; Michiels et al., 1994; Mráček et al., 2009).

Hlavními producenty ROS v rámci ETC jsou komplexy I a III, dále mohou ROS vznikat také na komplexu II a na ETF-QO, která umožňuje vstup elektronů z ETF. Na komplexu I je hlavním potenciálním místem vzniku ROS FeS centrum či flavin v aktivním místě. Bylo ukázáno, že za fyziologických podmínek je produkce ROS komplexem I a II buď minimální, nebo je vyrovnána funkcí antioxidantů. Na komplexu III jsou místem vzniku ROS centra Q_i a Q_o , která jsou součástí Q cyklu. Ukazuje se, že hlavním producentem ROS v srdečních mitochondriích je centrum Q_o . Ubisemichinon vyskytující se v tomto centru může uvolnit elektron. Vzhledem k umístění centra Q_o v rámci komplexu III se zdá, že centrum Q_o produkuje ROS spíše do mezimembránového prostoru než směrem do matrix. Centrum Q_i produkuje ROS směrem do matrix (St-Pierre et al., 2002; Turrens, 2003). K produkci ROS v mitochondriální matrix mohou přispívat také solubilní matrixové proteiny (Grivennikova et al., 2010).

Původní představa vycházející z měření maximální produkce ROS *in vitro* byla, že 3-5 % kyslíku využívaného při oxidační fosforylaci dá vznik ROS v důsledku úniku elektronů z ETC (Michiels et al., 1994). Tato představa však byla upravena a dnes se předpokládá, že na ROS je přeměněno méně než 1 % kyslíku (Hansford et al., 1997; Grivennikova et al., 2010). Respirace se substráty komplexů I a II (glutamát a malát nebo sukcinát) vede k přeměně 0,8-0,3 % totální spotřeby kyslíku na H_2O_2 . Za přítomnosti ADP tento podíl ještě klesá na cca 0,03 % (Grivennikova et al., 2010). Produkce ROS v ETC je závislá na elektrochemickém potenciálu na IMM. Zvýšení membránového potenciálu na IMM, stejně jako inhibice některých komplexů ETC vede k prodloužené existenci přenašečů elektronů v ETC, což zvyšuje pravděpodobnost předání elektronu na molekulární kyslík (Hansford et al., 1997; Korshunov et al., 1997)

Prvním zástupcem ROS vznikajícím přechodem volného elektronu na molekulu kyslíku je superoxidový radikál $\text{O}_2^{\bullet-}$ (superoxid), který se následně může přeměnit na jiné ROS. Dvě molekuly superoxidu se dismutací, která může být spontánní či katalyzovaná superoxiddismutázami (SOD), mění na peroxid vodíku a molekulu kyslíku. Peroxid vodíku je lipofilnější a stabilnější než superoxid, a tudíž může v buňce difundovat na poměrně velké

vzdálenosti. Bylo však popsáno, že difuze peroxidu vodíku přes mitochondriální membrány je omezená (Grivennikova et al., 2010). Kompletní redukci peroxidu vodíku na molekulu vody (či molekulu vody a kyslíku) katalyzují antioxidační enzymy glutathion peroxidáza (GPx) a kataláza. Pokud je redukce částečná katalyzovaná tranzitními kovy (Fentonova reakce – rovnice 1), případně reaguje-li peroxid vodíku se superoxidem (Haber-Weissova reakce – rovnice 2), vzniká další zástupce ROS – hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), který je sice nestabilní, ale má velmi silné oxidační účinky (Turrens, 2003).



Další skupina reaktivních molekul je odvozena od dusíku. Mezi reaktivní dusíkové molekuly (RNS) patří reaktivní nitrity a nitráty, z nichž nejznámější je peroxynitrit, který vzniká v důsledku reakce oxidu dusnatého (NO) s kyslíkem (Venardos and Kaye, 2007).

Zvýšená produkce ROS a RNS (RONS) vede k mnoha patologickým stavům, na druhé straně se však radikály účastní celé řady buněčných funkcí. RONS se účastní buněčné signalizace, peroxid vodíku a superoxid stimulují některé transkripční faktory, jako jsou HIF-1 (hypoxií indukovaný transkripční faktor-1), NFκB (nukleární faktor kappa B), AP-1 (aktivátorový protein-1), podporují aktivitu mitogenem aktivovaných proteinkináz a tyrozinových kináz a zároveň inaktivují tyrozinové fosfatázy. V souvislosti s RONS signalizací bylo popsáno také zvýšení intracelulární hladiny vápenatých iontů či aktivace apoptózy (Touyz, 2004).

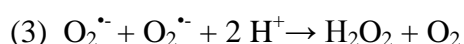
Jako oxidační stres označujeme situaci, kdy dochází k porušení rovnováhy mezi vznikem RONS a jejich odstraňováním pomocí antioxidačního systému buňky. Stav dlouhodobě zvýšeného oxidačního stresu je provázen poškozením buněčných molekul a následným poškozením celé buňky vedoucím k buněčné smrti (Turrens, 2003). RONS vedou např. k peroxidaci lipidů, čímž porušují membránovou integritu, ke vzniku zlomů na DNA či k oxidaci proteinů, což může vést ke ztrátě jejich funkce (Venardos and Kaye, 2007). Poškození v důsledku oxidačního stresu přispívá k mnoha patologickým stavům a je považováno za jednu z příčin stárnutí (Harman, 2006; Venardos and Kaye, 2007; Touyz, 2004).

2.1.3 Antioxidační enzymy

Aby buňky předcházely buněčnému poškození plynoucímu z oxidačního stresu, využívají antioxidanty, kterými udržují hladinu RONS v buňce na nízké úrovni. Antioxidanty se mohou uplatnit na několika úrovních. Jednak inhibují vznik RONS, omezují jejich vzájemné přeměny vyvazováním iontů kovu či přímo odstraňují samotné RONS, nebo jejich prekurzory (Venardos and Kaye, 2007). Antioxidační systém se podílí na udržování patřičného redoxního stavu buňky a sestává z neenzymových antioxidantů a antioxidačních enzymů. Mezi neenzymové antioxidanty se řadí vitaminy (vitamin C - kyselina askorbová, vitamin E – tokoferol), thiolové antioxidanty (glutathion, kyselina lipoová), karotenoidy, flavinoidy, melatonin a další. Mezi nejúčinnější antioxidační enzymy patří SOD, kataláza a GPx (Chen et al., 2012).

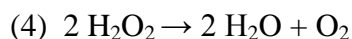
V srdečních buňkách hrají významnou úlohu při antioxidační obraně buňky zejména SOD, kataláza, GPx a thioredoxin peroxidázy neboli peroxiredoxiny (Prx) (obrázek 2.4) (Venardos and Kaye, 2007).

První stupeň ochrany proti ROS, konkrétně proti superoxidovým radikálům tvoří SOD. Existují tři izoformy SOD, které katalyzují přeměnu dvou molekul superoxidu na peroxid vodíku a kyslík:



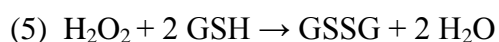
V mitochondriální matrix se nachází SOD s manganem v aktivním místě – MnSOD (SOD2), jejíž funkční formou je homotetramer (96 kDa) (Zelko et al., 2002). Atom manganu v aktivním místě každé podjednotky cykluje během reakce mezi stavy Mn(III) a Mn(II) (Matés et al., 1999). MnSOD jako mitochondriální antioxidační enzym představuje základní ochranu proti ROS vznikajícím v mitochondriích. V cytoplazmě a mezimembránovém prostoru mitochondrií, jaderném prostoru a lysosomech nalezneme měď-zinkovou SOD (Cu/ZnSOD; SOD1), která tvoří homodimer (64 kDa). Existuje také extracelulární SOD (SOD3), která váže také měď a zinek a tvoří tetramer. Ta je exprimována pouze některými buněčnými typy, mezi které patří např. hladké svalstvo cév. SOD3 je přítomná také v srdci (Zelko et al., 2002).

Peroxid vodíku vznikající dismutací je odstraňován katalázou a GPx. Kataláza je tetrametrický enzym (240 kDa) nacházející se zejména v peroxizomech (v nízkých koncentracích také v cytosolu) a katalyzuje přeměnu H_2O_2 na molekulární kyslík a vodu (rovnice 4). Přítomnost katalázy byla identifikována také v mitochondriální matrix kardiomyocytů (Nohl and Hegner, 1978; Radi et al., 1991). Bylo popsáno, že v srdci potkanů představuje kataláza 0,025 % mitochondriálního proteinu (Radi et al., 1991).



Kataláza obsahuje ve svém aktivním místě porfyrinovou skupinu a kromě odstraňování peroxidu vodíku se účastní také oxidace alkoholů s krátkým řetězcem na aldehydy (Day, 2009).

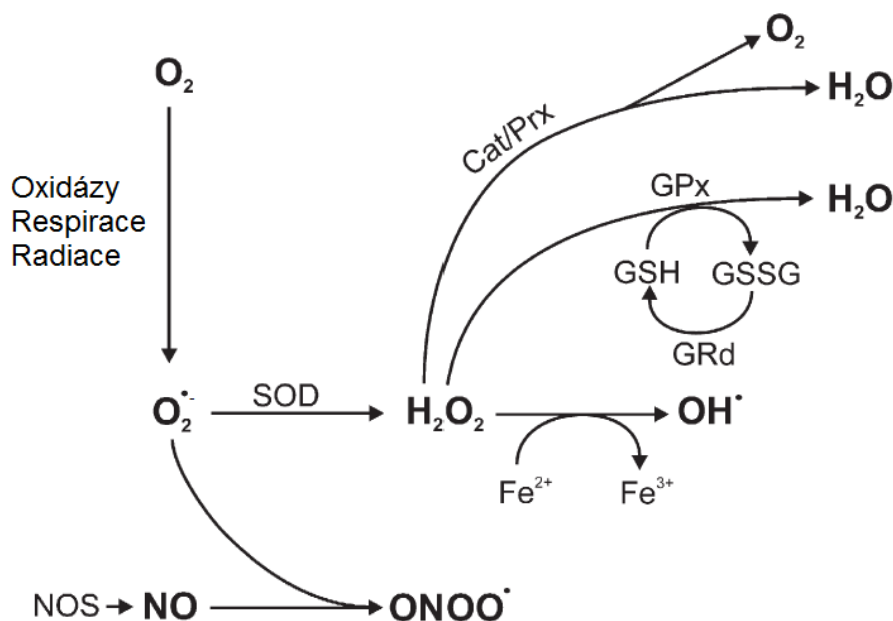
Rodina GPx představuje enzymy, které přeměňují H_2O_2 na vodu za přítomnosti glutathionu. Glutathion je tripeptid skládající se z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Thiolová skupina cysteinu nacházejícího se v molekule glutathionu je schopna tvořit disulfidický můstek, čehož je využito během redukce peroxidu vodíku enzymem GPx. Výsledkem reakce katalyzované GPx je oxidovaný glutathion tvořící dimer spojený disulfidickým můstkem (rovnice 5; GSH – redukovaný glutathion; GSSG – oxidovaný glutathion). Ten je poté regenerován pomocí glutathion reduktázy za využití NADPH. GPx mají schopnost reagovat také s lipidovými a jinými organickými hydroperoxidy (Matés et al., 1999).



GPx jsou tetrametrické enzymy (80 kDa), které obsahují v každé podjednotce selenocystein. GPx se nachází jak v cytosolu, tak i v mitochondriích (Day, 2009).

Další skupinou enzymů schopných redukovat H_2O_2 jsou Prx. Oxidovaný enzym je následně regenerován nepřímo pomocí thioredoxin reduktázy (Day, 2009).

Obrázek 2.4 - Schéma působení hlavních antioxidačních enzymů



V buňkách vzniká z kyslíku superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$) v důsledku respirace, radiace či funkce oxidáz. $O_2^{\bullet-}$ je pomocí superoxidodismutáz (SOD) přeměněn na peroxid vodíku (H_2O_2), který může po reakci s ionty železa poskytovat hydroxylový radikál (OH^{\bullet}), který je pro buňku nebezpečný. Proto je H_2O_2 přeměňován pomocí katalázy (Cat) a peroxiredoxinů (Prx) na vodu a kyslík nebo pomocí glutathionperoxidázy (GPx) na vodu za současné oxidace glutathionu (GSSG – oxidovaný glutathion; GSH – redukovaný glutathion; GRd – glutathionreduktáza). Alternativně může superoxidový radikál reagovat s oxidem dusnatým (NO), který je produkován NO syntázou (NOS), za vzniku toxického peroxinitritu ($ONOO^{\bullet}$). (převzato a upraveno z Schreibelt et al., 2007)

2.1.4 Mitochondriální genom

Mitochondriální genom savců je tvořen dvouřetězcovou cirkulární molekulou DNA, která se nachází v každé mitochondrii přibližně ve dvou až deseti kopiích, v každé buňce pak ve stovkách až tisících kopiích. Všechny kopie mtDNA mají většinou shodnou sekvenci (homoplazmie), v některých buňkách je však možné najít i více mitochondriálních genotypů současně (heteroplazmie) (Pearce et al., 2012).

Velikost mtDNA savců je cca 16500 párů bází a kóduje 37 genů (2 rRNA, 22 tRNA a 13 proteinů). Součástí mtDNA je dále nekódující úsek obsahující elementy regulující replikaci a transkripci (D-loop). mtDNA neobsahuje introny a geny jsou v těsné blízkosti s minimálními či žádnými intragenovými oblastmi (Blier et al., 2001; Pearce et al., 2012).

Jednotlivá vlákna dvouřetězcové mtDNA se liší svým nukleotidovým složením, což vede k rozdílné vznášivé hustotě vláken, podle které se dělí na těžké vlákno (H) a lehké vlákno (L). Většina genů se nachází na těžkém vlákně (12 proteinů, 2 rRNA, 14 tRNA), lehké vlákno kóduje 1 protein a 8 tRNA (Pearce et al., 2012).

Proteiny kódované savčí mtDNA jsou výhradně transmembránové podjednotky komplexů oxidační fosforylace. Jedná se konkrétně o 7 podjednotek NADH dehydrogenázy (komplex I) – ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 - dále 1 podjednotku cytochromu bc1 (komplex III) – CYTB – 3 podjednotky COX (komplex IV) – COX-1 (MTCO1), COX-2, COX-3 – a 2 podjednotky ATP syntázy (komplex V) – ATP6, ATP8 (Obrázek 2.5; Pearce et al., 2012).

Vzhledem k tomu, že některé podjednotky komplexů oxidační fosforylace jsou kódovány jadernou DNA a jiné mtDNA, je třeba těsné kooperace mezi produkcí podjednotek v různých místech v buňce. Jaderné respirační faktory, které mají schopnost regulovat jak jaderné geny účastníci se respirace, tak i mitochondriální transkripci a translaci, zabezpečují transkripční kontrolu jednotlivých genů pro podjednotky komplexů oxidační fosforylace (Smeitink et al., 2001).

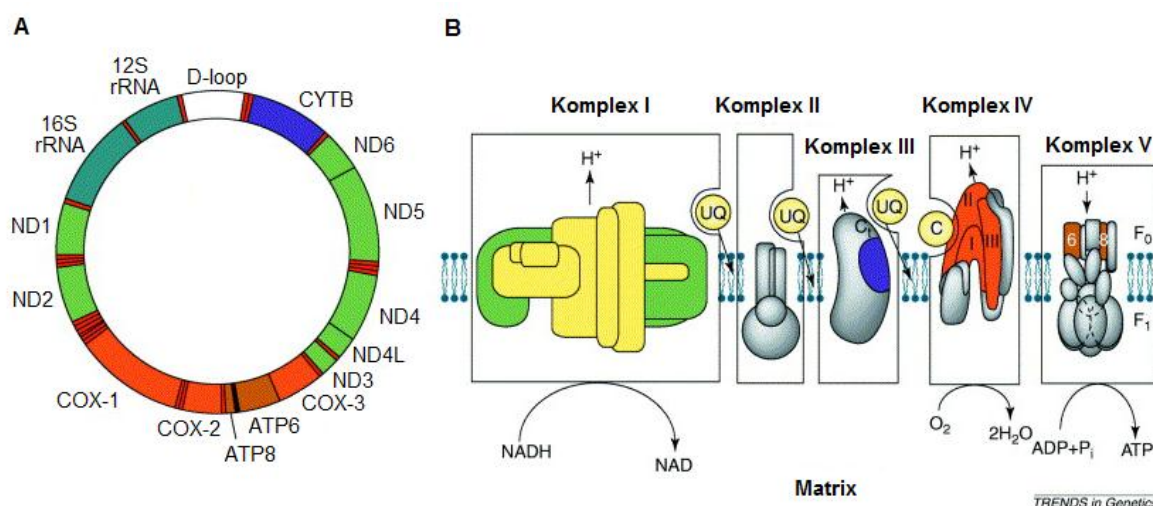
Význam proteinů oxidační fosforylace v produkci energie činí mutace v mtDNA velmi významnými. Defekty oxidační fosforylace způsobené změnami mitochondriální či jaderné DNA vedou k mnoha systémovým onemocněním. Mezi nejznámější onemocnění spojené s poškozením komplexů oxidační fosforylace patří Leighův syndrom, nebo Leberova hereditární optická neuropatie, kterou způsobuje mutace některé z podjednotek komplexu I (ND1, ND4 nebo ND6) (Smeitink et al., 2001).

Replikace mtDNA probíhá nezávisle na buněčném cyklu. Replikační aparát sestává ze specifických mitochondriálních proteinů s účastí některých složek jaderné replikace, jako jsou RNáza H1 a DNA ligáza III. Transkripce mtDNA je zajišťována mitochondriální RNA polymerázou a poskytuje polycistronní transkripty, neboť transkripce mtDNA je iniciována pouze ze 3 promoterů. Translace probíhá na mitoribozomu 55S, který se liší jak od savčího, tak od bakteriálního ribozomu (Pearce et al., 2012).

mtDNA je děděna maternálně, neboť mitochondrie spermie jsou po fertilizaci odstraněny pravděpodobně procesem autofágie (Al Rawi et al., 2011). Pouze omezené množství

maternálních mitochondrií dá vznik mitochondriální populaci vyvíjejícího se plodu (Blok et al., 1997).

Obrázek 2.5 - Proteiny kódované mitochondriální DNA



Mitochondriální DNA (A) je cirkulární molekula DNA kódující 13 proteinů, 2 rRNA (zelenomodrá) a 22 tRNA (červená). D-loop je regulační oblast (bílá). Proteiny kódované mitochondriální DNA se účastní oxidační fosforylace (B). Sedm proteinů je součástí komplexu I (zelená), jeden protein je součástí komplexu III (modrá), tři proteiny jsou podjednotkami komplexu IV (oranžová) a dva proteiny jsou součástí komplexu V (hnědá). UQ – koenzym Q; C – cytochrom c; (převzato a upraveno z Blier et al., 2001)

2.2 Spontánně hypertenzní potkani (SHR)

Hypertenze je komplexní polygenní onemocnění, které je ovlivňováno jednak geneticky a jednak prostředím. Hypertenze představuje významný rizikový faktor pro řadu kardiovaskulárních onemocnění, jako je infarkt myokardu, mrtvice nebo městnavé srdeční selhání (Hubner et al., 2006). Rozlišujeme dva základní druhy hypertenze – hypertenzi esenciální (vyvíjející se spontánně bez zjevných příčin) a hypertenzi sekundární, která vzniká druhotně např. jako důsledek jiného onemocnění (Cowley, 2006).

Kmen spontánně hypertenzních potkanů (SHR) je inbrední kmen potkanů odvozený od kmene Wistar-Kyoto (WKY) křížením spontánně hypertenzních jedinců a slouží jako základní a nejpoužívanější model esenciální hypertenze. SHR potkani vyvíjí spontánně hypertenzi přibližně mezi 10. a 15. týdnem života (Okamoto and Aoki, 1963).

SHR potkani zároveň slouží jako model metabolického syndromu. Jsou inzulín rezistentní a hyperinzulinemičtí, vykazují cca 2,4krát vyšší hladinu inzulínu než kontrolní potkani (Hajri et al., 2001). Dále byla u těchto potkanů popsána hypertriglyceridemie a glukózová intolerance (Reaven and Chang, 1991).

SHR potkani vykazují sníženou produkci ATP a zvýšený oxidační stres, což naznačuje mitochondriální dysfunkci. Energetický stav jednotlivých tkání se však liší, v srdečních buňkách SHR je snížení energetického stavu méně výrazné než např. v játrech (Postnov et al., 2007). Srdce SHR potkanů vykazují sníženou kontraktilitu, což může souviset se sníženou rychlostí obratu ATP. Aktivita aktomyosinového komplexu u SHR je téměř poloviční v porovnání s kontrolními potkany WKY (Hickey et al., 2009).

Zvýšený oxidační stres a zvýšené oxidační poškození zejména levé komory (LV) je možno pozorovat u SHR již 13 týdnů po narození. Bylo popsáno, že hypertenze je úzce spjata s oxidačním stresem a inhibice vzniku ROS nebo zvýšení antioxidační ochrany buněk snižuje krevní tlak a potlačuje vznik hypertenze u většiny modelů (Hickey et al., 2009; Touyz, 2004).

SHR mají menší přírůstky, což vede k signifikantně snížené hmotnosti těla vůči WKY již v 10. dni života. SHR potkani vyvíjejí hypertrofii srdce (zejména LV), která je způsobena zvětšováním objemu jednotlivých buněk. Hmotnost srdce je u SHR signifikantně vyšší již od prvního dne života ve srovnání s WKY. Hypertrofie se vyvíjí následkem tlakového přetížení LV. Ačkoli vzniká jako adaptivní odpověď a umožňuje udržovat funkci srdce za patologických podmínek, jejím následkem je funkční poškození myokardu a zvyšující se riziko vzniku arytmií. Vztah mezi hypertrofií a hypertenzí je však pravděpodobně složitější, bylo totiž prokázáno, že jedinci s genetickými predispozicemi pro vznik hypertenze vyvíjejí hypertrofii, ačkoli mají krevní tlak v normálu (Cabassi et al., 2007; Charvátová et al., 2012; Jennings and Lockett, 2000).

Dospělí potkani SHR vykazují zvýšenou citlivost na ischemii v porovnání s WKY (Bešík et al., 2007). U novorozených potkanů SHR (1 den) je citlivost k ischemii naopak nižší ve srovnání s WKY, v 10. dni je citlivost srovnatelná (Charvátová et al., 2012).

V 18-24 měsících postnatálního života dochází u SHR potkanů k srdečnímu selhávání, které se projevuje poškozením systolické i diastolické funkce (Jüllig et al., 2008). Přechod

k srdečnímu selhání je doprovázen myokardiální fibrózou, zvýšenou pasivní ztuhlostí a poškozením kontraktilní funkce (Conrad et al., 1995).

Byl identifikován konkrétní úsek chromozomu 4, který má souvislost s metabolickými změnami doprovázejícími SHR fenotyp. Bylo popsáno, že nahrazení tohoto úseku chromozomu 4 úsekem chromozomu z normotenzních potkanů Brown Norway (BN) vede k významnému snížení krevního tlaku u SHR potkanů. Snížena byla také inzulinová rezistence a byly pozorovány nižší hladiny volných mastných kyselin a triglyceridů v séru po podání vysokofruktóзовé diety (Klevstig et al., 2011; Pravenec et al., 1999). V této oblasti chromozomu 4 byl identifikován gen pro CD36, což je translokáza mastných kyselin, které představují hlavní energetický zdroj srdečního svalu. Tato translokáza chybí na cytoplazmatických membránách adipocytů a kardiomyocytů SHR potkanů (Hajri et al., 2001). Bylo potvrzeno, že exprese CD36 v ledvinách negativně koreluje se systolickým i diastolickým krevním tlakem. Nejde však o pouhou nepřítomnost funkčního CD36, neboť fenotyp SHR se značně liší od myši s deletovaným CD36, které jsou hypoglykemické a hypoinzulinemické (Hajri et al., 2001).

2.2.1 SHR mitochondrie

Transmisní elektronová mikroskopie prokázala v mitochondriích srdečních buněk 12 měsíců starých SHR snížený počet krist vůči WKY. Mitochondrie se také zdály být méně uspořádané a zvětšené. Změny uspořádání mitochondrií mohou vést ke změnám vzdáleností mezi jednotlivými kompartmenty buňky, ke zhoršení přenosu energie a k poškození funkce celého svalu (Hickey et al., 2009).

U SHR bylo pozorováno zvýšení hladin proteinů účastnících se biogeneze mitochondrií, mitofilinu, některých chaperonů a Tu translačního elongačního faktoru, což odpovídá skutečnosti, že u SHR je vyšší výskyt nově produkovaných mitochondrií. Je třeba podotknout, že biogeneze mitochondrií je většinou aktivována v důsledku jejich zvýšeného poškození (Jüllig et al., 2008).

Snížená produkce ATP a zvýšená hladina ROS pozorovaná u SHR potkanů souvisí patrně s rozprážením oxidační fosforylace. Bylo popsáno, že experimentálně navozená exprese mitochondriálního rozpráhujícího proteinu vede ke zvýšení krevního tlaku. Elektronová

mikroskopie odhalila, že během vývoje hypertenze u SHR dochází ke změnám struktury mitochondrií, které odpovídají změnám, ke kterým dochází při rozpřažení oxidační fosforylace (Postnov et al., 2007).

2.2.2 Energetický metabolismus u SHR

SHR vykazují změny v metabolismu tuků a cukrů. Byla u nich popsána snížená oxidace mastných kyselin a zvýšená oxidace glukózy. To může být důsledkem hypertrofie srdce, která provází hypertenzi a vede k relativnímu snížení vaskulární denzity, a tedy k horší dostupnosti kyslíku k buňkám, přičemž využití glukózy jako energetického zdroje poskytuje přibližně o 10 % ATP na mol kyslíku více než využití mastných kyselin (Christe and Rodgers, 1994).

Pokles metabolismu mastných kyselin může souviset také s jejich sníženým vstupem do buněk v důsledku mutované translokázy mastných kyselin CD36, což může mít za následek změny metabolismu glukózy, neboť nedostatek mastných kyselin jako metabolického substrátu je kompenzován zvýšeným vstupem glukózy do buněk. Tyto změny mohou ovlivňovat inzulinovou signalizaci, což může vést až ke zmíněné inzulinové rezistenci či hyperinzulinémii (Hajri et al., 2001).

V mitochondriích LV SHR potkanů, kteří již vyvinuli hypertrofii, ale zatím vykazují normální krevní tlak, bylo detekováno 17 proteinů účastnících se energetického metabolismu, jejichž množství se výrazně liší od WKY. Jednalo se zejména o enzymy účastnící se oxidační fosforylace, dále oxidace mastných kyselin, Krebsova cyklu, glykolýzy a oxidace pyruvátu. Tyto změny jsou pozorovány také po vývoji hypertenze a některé parametry se dále signifikantně mění s věkem SHR (Meng et al., 2009).

Jiná studie identifikovala u stárnoucích potkanů (20 měsíců) 137 proteinů, z nichž 79 vykazovalo signifikantní rozdíly mezi SHR a WKY (2/3 rostou a 1/3 klesá u SHR). Zvýšené množství u SHR bylo prokázáno u mitochondriálních chaperonů, podjednotek pyruvátdehydrogenázy či proapoptotických faktorů. Oproti tomu hladina většiny proteinů účastnících se oxidace mastných kyselin byla snížena (Jüllig et al., 2008).

2.2.2.1 Krebsův cyklus

U SHR byly pozorovány také změny v Krebsově cyklu. Koncentrace enzymů prvních reakcí Krebsova cyklu byla zvýšena, zatímco sukcinátdehydrogenáza a fumaráthydratáza vykazovaly pokles vzhledem k WKY. To může mít za následek hromadění sukcinátu a fumarátu, které podporují anaerobní glykolýzu (Jüllig et al., 2008).

U dvanáctiměsíčních potkanů nebyly v aktivitě CS pozorovány žádné změny mezi SHR a WKY (Hickey et al., 2009), zatímco u potkanů starých 20 měsíců jsou CS a MDH aktivity u SHR sníženy téměř na polovinu. Hladina CS však byla u SHR zvýšena, což naznačuje poškození její funkce. Aktivita sukcinátdehydrogenázy měla tendenci ke snížení (Jüllig et al., 2008).

2.2.2.2 Oxidační fosforylace

SHR vykazují také změny na úrovni proteinů účastnících se oxidační fosforylace. Bylo zjištěno, že mají vyšší aktivitu ETC před zátěží ve srovnání s WKY, ovšem zvýšená zátěž u SHR snižuje aktivitu zejména komplexu I (Hickey et al., 2009).

Již u 4 týdnů starých SHR byl pozorován významný pokles koncentrace podjednotky komplexu V (Atp5o), což pravděpodobně souvisí s pozorovaným snížením syntézy ATP. Podjednotky komplexů ETC související s produkcí ROS byly naopak zvýšeny – Ndufs1 (podjednotka komplexu I) a Sdha (podjednotka komplexu II). U SHR byly před vývojem hypertenze popsány významné změny Ndufa10, což je podjednotka komplexu I. Pomocí sekvenční analýzy byly v genu pro tento protein prokázány 2 bodové mutace. Tyto mutace mají za následek rozdíl v aminokyselinové sekvenci Ndufa10 u SHR vůči WKY (Meng et al., 2009). Tyto změny v proteinech oxidační fosforylace byly pozorovány u 4 týdnů starých potkanů, tedy jedinců, kteří ještě nevyvinuli hypertenzi, ale již vykazovali známky hypertrofie LV. Některé změny byly pozorovány již ve stáří 1 týdne, tedy před vznikem hypertrofie, což naznačuje, že tyto změny jsou ovlivněny genetickými faktory a jsou možná příčinou dalších poruch (Meng et al., 2009).

U 18 měsíců starých potkanů SHR byla pozorována významně snížená aktivita komplexu IV (43 %), přestože množství proteinu stanovených podjednotek komplexu IV bylo u SHR vyšší, nebo shodné s WKY. Byla také pozorována zvýšená citlivost na přidání cytochromu c,

což poukazuje na sníženou stabilitu vnější mitochondriální membrány. Množství některých podjednotek komplexů I a III bylo zvýšeno, zatímco množství podjednotek komplexu II bylo sníženo, stejně jako aktivita komplexu II. Snížen byl také obsah podjednotek komplexu V. Otázkou je, zda tyto změny nesouvisí již se srdečním selháváním, které u SHR potkanů kolem 20 měsíce věku nastává (Jüllig et al., 2008). Poškození komplexů ETC může mít za následek zvýšenou produkci ROS pozorovanou u SHR.

2.2.3 Antioxidační systém u SHR

Aktivita GPx je u 4 týdnů starých potkanů SHR snížena jak v játrech, tak i v srdci oproti WKY, což může být dáno snížením poměru GSH/GSSG. Oproti tomu aktivita glutathionreduktázy je u SHR potkanů zvýšena a v aktivitě SOD nejsou pozorovány rozdíly vůči normotenzním WKY. Aktivita katalázy se liší mezi sledovanými tkáněmi, zatímco v jaterní tkáni je aktivita katalázy u SHR potkanů zvýšena, v srdci nebyly pozorovány žádné rozdíly. Marker zvýšeného oxidačního stresu – peroxidace lipidů je zvýšena u SHR ve srovnání s WKY (Gómez-Amores et al., 2006)

Osmnáctiměsíční SHR potkani mají zvýšené aktivity antioxidačních enzymů (MnSOD, Cu/ZnSOD, GPx) v srdci a vykazují tedy vyšší antioxidační potenciál než WKY. Množství i aktivita katalázy se neliší. Zvýšený oxidační stres způsobený přidáním H_2O_2 nebo ischemicko-reperfúzním poškozením nepoškodí funkci srdce SHR, zatímco WKY vykazují zhoršenou funkci (Csonka et al., 2000).

2.3 Konplastický kmen

Konplastické kmeny, tedy kmeny s jaderným genomem jednoho inbredního kmene a mitochondriálním genomem druhého inbredního kmene potkanů, jsou možností jak studovat účast mitochondrií při některých komplexních onemocněních. Sledování vlivu mitochondriálního genomu na pozadí jaderného genomu jiného kmene vede k odfiltrování vlivu variability jaderného genomu, což umožňuje jednoznačně popsat vliv mitochondriálního genomu na komplexní znaky (Pravenec et al., 2007).

Z porovnání šestnácti polymorfismů mitochondriálního genomu mezi inbredními kmeny laboratorních potkanů vyplývá, že běžné laboratorní kmeny (43 kmenů) se dají rozdělit do

čtyř haplotypů (SHR, BN, LEW, F344) (Pravenec et al., 2007). V této studii byl použit konplastický kmen potkanů odvozený od kmene SHR, do něhož byly vneseny mitochondrie kmene BN.

2.3.1 Srovnání kmenů SHR a BN (Brown Norway)

Kmen BN je rezistentnější k ischemii v porovnání s potkany Dahl S, Dark Agouti, Lewis a Wistar (Baker et al., 2000). Také velikost infarktu je u BN asi o 63 % menší, což pravděpodobně souvisí se zvýšenou hladinou NO, která poskytuje BN kmeni ochranu před ischemickým poškozením (Shi et al., 2005).

BN potkani jsou rezistentní k vyvolání hypertenze deoxykortikosteronacetát-solnou metodou, která způsobuje poškození funkce ledvin (Churchill et al., 1997).

Porovnáním kódující sekvence genu pro translokázu mastných kyselin CD36 mezi potkany SHR, WKY a BN bylo nalezeno 7 aminokyselinových záměn v exonu 6 a výrazné rozdíly v 3' nekódující sekvenci SHR potkanů vůči BN a WKY. U kmenů WKY a BN byla navíc pozorována duplikace genu pro CD36. BN potkani jsou oproti inzulín rezistentním potkanům SHR inzulín senzitivní (Aitman et al., 1999).

SHR se od BN liší 3,6 miliony jednonukleotidovými polymorfismy a 343243 krátkými indely (inzerce nebo delece), což vede k 161 případům zisku či ztráty STOP kodónu a 629 posunům čtecího rámce. SHR dále vykazuje přítomnost 13438 větších delecí, které mají za následek kompletní či částečnou absenci 107 genů v porovnání s referenční sekvencí BN (Atanur et al., 2010).

2.3.2 Konplastický kmen SHR-mt^{BN}

Konplastický kmen potkanů SHR-mt^{BN} (oficiální název SHR/OlaIpcv-mt^{BN/Crl}) byl vytvořen ze dvou inbredních kmenů potkanů (SHR/OlaIpcv a BN/Crl) ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky. Tento kmen byl vytvořen nahrazením mitochondriálního genomu kmene SHR (SHR/OlaIpcv) mitochondriálním genomem kmene BN (BN/Crl), k čemuž bylo využito řízené křížení těchto dvou kmenů. K urychlení procesu křížení byla použita “supersonická” strategie křížení vyvinutá roku 1998 (Behringer, 1998; Pravenec et al., 2007)

Samec SHR byl křížen se samicí BN za vzniku potomstva (F1). U samic F1 starých čtyři týdny byla indukována superovulace pomocí sérového gonadotropinu březích klisen a lidského choriového gonadotropinu podávaných s odstupem 48 hodin. Superovulované samice F1 byly kříženy se samci SHR. Oplodněná vajíčka byla po 1. dni březosti vyjmuta a ve stadiu dvoubuněčných embryí byla přenesena do vejcovodů pohlavně dospělých pseudopregnančních samic SHR (vždy 7-9 embryí), které byly kříženy se sterilními samci. F2 generace se narodila cca po 3 týdnech od přenosu embryí a posloužila pro další takové křížení. Potkani použiti pro studii byli výsledkem 7-9 generací zpětných křížení, což by mělo poskytnout genomickou shodu s původním inbredním kmenem z 98,4 – 99,6 % (Pravenec et al., 2007; Silver, 1995). Sledování polymorfních markerů jaderného genomu nicméně neprokázalo žádné rozdíly, a je tedy pravděpodobné, že jaderné genomy konplastického kmene a kmene původního jsou identické (Pravenec et al., 2007).

Kontrolní kmen SHR (obsahující mitochondrie haplotypu SHR) a konplastický kmen SHR-mt^{BN} (s mitochondriemi kmene BN) tedy nesou shodný jaderný genom (typu SHR), ale liší se mitochondriálním genomem, což v tomto případě vede k odlišnostem aminokyselinového řetězce sedmi proteinů oxidační fosforylace (COX-1 (MTCO1), ATP6, ATP8, CYTB, ND2, ND4, ND6) (obrázek 2.6). Jako nejvýznamnější byla zatím popsána Phe-Leu substituce v podjednotce I komplexu IV, která má pravděpodobně za následek snížení aktivity a koncentrace COX v jaterních mitochondriích konplastického kmene. Další odlišnosti lze nalézt v pěti mitochondriálních tRNA genech a ve dvou genech pro mitochondriální rRNA (Pravenec et al., 2007).

Konplastický kmen SHR-mt^{BN} vykazuje sníženou toleranci ke glukóze, snížení hladiny glykogenu a ATP v kosterním svalstvu a výše popsané změny v COX ve srovnání s SHR. Tyto vlastnosti činí z kmene SHR-mt^{BN} model dědičné formy fenotypu rizikových faktorů pro diabetes typu II, což naznačuje, že změny mitochondriálního genomu mohou vést k navození patologie některých onemocnění (Pravenec et al., 2007).

Konplastický kmen SHR-mt^{BN} se neliší signifikantně od SHR ve velikosti infarktu a v četnosti arytmií po akutní ischemii. Velikost infarktu u SHR-mt^{BN} je sice nižší než u SHR, tento rozdíl však není statisticky významný (Zajíčková, 2013).

Obrázek 2.6 - Rozdíly v mitochondriálním genomu mezi potkany SHR a BN

gen	nukleotid	kodón		aminokyselina	
		BN	SHR	BN	SHR
ND2	3956	GTA	GCA	Val	Ala
	4352	AAC	AGC	Asn	Ser
	4633	ACA	GCA	Thr	Ala
	4696	GCA	ACA	Ala	Thr
MTCO1	5326	CTC	TTC	Leu	Phe
ATP8	7930	ACC	ATC	Thr	Ile
ATP6	8021	GAA	AAA	Glu	Lys
ND4	10227	ATC	ACC	Ile	Thr
	11225	GCA	ACA	Ala	Thr
	11360	GTC	ATC	Val	Ile
	11374	ATC	ATA	Ile	Met
ND6	13647	ATT	GTT	Ile	Val
	13974	CTT	TTT	Leu	Phe
CYTB	14775	GAC	AAC	Asp	Asn
	15135	ATC	GTC	Ile	Val

Tabulka popisuje rozdíly v mitochondriálním genomu spontánně hypertenzních potkanů (SHR) a potkanů Brown Norway (BN). Tyto kmeny vykazují rozdíly v 15 nukleotidech v protein-kódující oblasti vedoucí k aminokyselinovým záměnám v 7 proteinech účastnících se oxidační fosforylace (ND2, MTCO1, ATP8, ATP6, ND4, ND6, CYTB). (převzato a upraveno z Pravenec et al., 2007)

2.4 Adaptace na chronickou hypoxii

Hypoxie je stav nedostatečného zásobení buněk kyslíkem a dá se rozdělit na ischemickou hypoxii (ischemii), při které dochází ke snížení či zastavení průtoku krve cévami, a systémovou hypoxii (hypoxii), během které je snížen parciální tlak kyslíku v krvi v důsledku snížení parciálního tlaku kyslíku v atmosféře. Dále existuje anemická hypoxie, při které je snížena transportní schopnost krve (Ošťádal and Kolář, 2007).

Omezení přívodu kyslíku k buňkám vede ke vzniku nerovnováhy mezi množstvím kyslíku dodávaným tkáni a množstvím kyslíku potřebným pro správnou funkci buněk. Ischemie, stejně jako následná reperfúze, tedy obnovení toku krve, s sebou nesou poškození tkáně označované jako ischemicko-reperfúzní poškození (IRI), které může vést ke vzniku arytmií, poškození kontraktilní funkce srdce či k buněčné smrti. Na rozdíl od ischemie může mírná hypoxie způsobit metabolické změny, které umožňují adaptaci na tyto podmínky a stimulují dráhy endogenní protekce (Kolář and Ošťádal, 2004).

Již roku 1960 byla zveřejněna studie dokládající, že lidé žijící ve vysoké nadmořské výšce vykazují méně případů hypertenze, infarktů nebo ischemické choroby srdeční (Hurtado, 1960). Experimentálně bylo prokázáno zlepšení obnovy srdeční funkce, potlačení ventrikulárních arytmií a omezení velikosti infarktu po akutní ischemii v důsledku adaptace na chronickou hypoxii (Kolář and Ošťádal, 2004).

Účinky adaptace na chronickou hypoxii nicméně závisí na protokolu adaptačního procesu. Nepřetržité vystavení hypoxii během adaptace označujeme jako hypoxii kontinuální, zatímco pokud působení hypoxie přerušujeme normoxickými expozicemi, jedná se o hypoxii intermitentní (přerušovanou). Záleží také na délce či počtu expozic. Dále se dá hypoxie rozdělit na hypobarickou, při které je snížen celkový tlak vzduchu, a normobarickou, která je navozena snížením parciálního tlaku kyslíku (Ošťádal and Kolář, 2007). Významný faktor je také míra hypoxického působení, kardioprotektivní účinky byly popsány zejména pro mírnou hypoxii, která odpovídá podmínkám do cca 6000 metrů nad mořem, tedy množství kyslíku v atmosféře kolem deseti procent (Navarro et al., 1999). Vystavení extrémnějším hypoxickým podmínkám vede naopak ke snížení tolerance k ischemickému poškození (Joyeux-Faure et al., 2005).

Kromě dlouhodobého působení hypoxie byl popsán také protektivní efekt tzv. preconditioningu, který je definován jako velmi krátká (5 min), opakovaná vystavení srdce ischemii střídaná s reperfúzí (Murry et al., 1986). Preconditioning sice omezuje rozsah infarktu vyvolaného následnou delší ischemií, kardioprotektivní efekt však přetrvává kratší dobu než u chronické hypoxie, kde byla ochrana před ischemickým poškozením pozorována ještě po 35 dnech od návratu do normoxických podmínek. Antiarytmický efekt však vymizel již po 1 týdnu (Neckář et al., 2004; Schwartz et al., 2001).

K adaptaci na chronickou hypoxii přispívá stimulace erytropoézy a angiogeneze, což zlepšuje rozvod kyslíku. Tyto změny jsou zajištěny aktivací transkripčního faktoru HIF-1, který je regulátorem homeostázy kyslíku (Semenza, 2011). Erytropoetin produkovaný za hypoxických podmínek se sám může účastnit navození kardioprotekce, neboť vazba na receptory na srdečních buňkách spouští protektivní signální dráhy, z nichž nejvýznamnější se zdá aktivace dráhy fosfatidylinositol-3-kináza - proteinkináza B, která podporuje buněčný růst a má antiapoptotické účinky (Burger et al., 2009). Chronické vystavení hypoxii s sebou však

nese i negativní účinky jako je plicní hypertenze, polycythemie a hypertrofie LV (Ošťádal and Kolář, 2007).

V důsledku hypobarické hypoxie bylo popsáno snížení mitochondriální hmoty v kardiomyocytech. Bylo pozorováno zvýšení počtu mitochondrií za současného zmenšení jejich objemu. Tím by mohlo být docíleno zvýšení poměru povrch k objemu, což může být adaptací na nízký parciální tlak kyslíku v srdci (Ježková et al., 2002; Nouette-Gaulain et al., 2005). Mitochondrie se samy procesu adaptace účastní a to zejména produkcí ROS, změnami v energetickém metabolismu včetně změn komplexů oxidační fosforylace a modulací buněčné smrti (Ošťádal and Kolář, 2007).

2.4.1 Změny metabolismu v důsledku adaptace na chronickou hypoxii

Pravděpodobnou příčinou kardioprotektivního účinku adaptace na chronickou hypoxii je metabolická remodelace srdečního svalu, která vede k přizpůsobení se nižší dodávce kyslíku. Během adaptace na hypoxii dochází ke změnám vedoucím k udržení homeostázy a zároveň šetření energií, což může poskytovat ochranu během událostí vyžadujících zvýšený metabolismus a zvýšenou pracovní aktivitu (Ošťádal and Kolář, 2007). Byl popsán posun ve využívaných substrátech. Oxidace mastných kyselin je potlačena, zatímco metabolismus glukózy je zvýšen. Zároveň se zvyšuje respirační kapacita, tedy schopnost mitochondrií využívat kyslík (Rumsey et al., 1999). Jak již bylo zmíněno, využití glukózy jako energetického zdroje umožňuje produkovat cca o 10 % ATP na mol kyslíku více než využití mastných kyselin. Přítomnost volných mastných kyselin může navíc vést ke snížení účinnosti oxidační fosforylace, proto je omezení jejich využívání za nízké koncentrace kyslíku žádoucí. Popsané změny umožňují jednak zvýšit produkci energie mimo mitochondrie a jednak zlepšit účinnost produkce energie mitochondriemi, což umožňuje pokrytí energetických potřeb buňky za hypoxických podmínek. Zlepšení účinnosti oxidační fosforylace navíc současně reguluje produkci ROS (Essop, 2007).

Na posunu energetického metabolismu od využívání mastných kyselin k využití sacharidů se podílí zejména na kyslík citlivé transkripční modulátory. Hlavní roli zde hraje transkripční modulátor HIF-1, jehož úloha byla prokázána jak v preconditioningu, tak i v efektu chronické hypoxie (Eckle et al., 2008; Bohuslavová et al., 2010). HIF-1 je heterodimer skládající se z

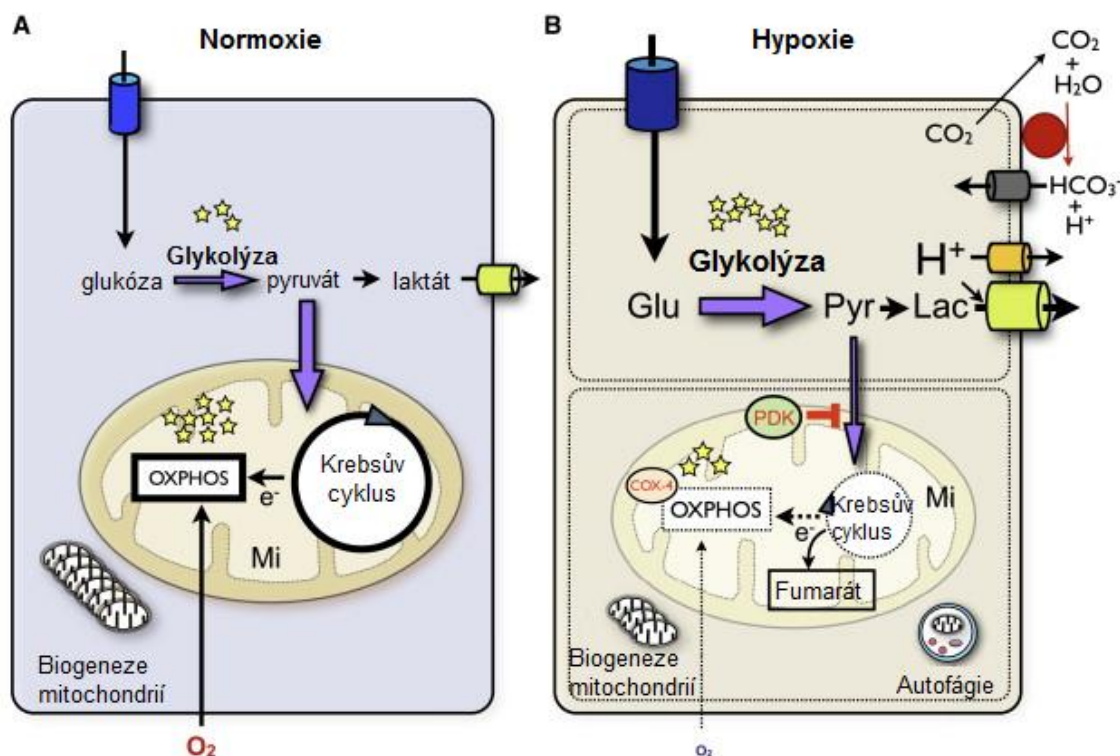
podjednotky β , která je stabilní, a z podjednotky α , jejíž stabilita je závislá na koncentraci kyslíku. Zatímco za normoxie je podjednotka α rychle degradována, během hypoxie je stabilizována a přechází do jádra, kde spolu s podjednotkou β váže specifické elementy na DNA (Essop, 2007). Transkripční faktor HIF-1 se účastní změn metabolismu pozorovaných po adaptaci na chronickou hypoxii vedoucí k lepšímu využití kyslíku a k omezení produkce ROS několika mechanismy (obrázek 2.7):

- aktivuje expresi kinázy pyruvátdehydrogenázy, čímž omezuje vstup pyruvátu do Krebsova cyklu
- aktivuje expresi transportéru pro glukózu GLUT-1 a enzymů účastnících se glykolýzy
- aktivuje výměnu izoform podjednotky COX-4 komplexu IV (izoforma 2 nahradí izoformu 1), což optimalizuje aktivitu komplexu IV
- aktivuje BNIP3 (Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interagující protein 3), který aktivuje mitofági
- indukuje miRNA-210, která omezuje sestavování FeS center účastnících se oxidační fosforylace (Semenza, 2011; Essop, 2007)

Zvýšení rychlosti glykolýzy za současného omezení vstupu pyruvátu do Krebsova cyklu má za následek částečné zastoupení anaerobní glykolýzy, která vede k produkci laktátu. Laktát je významným energetickým zdrojem pro srdeční buňky, nicméně bylo popsáno, že za hypoxických podmínek je laktát produkovaný kardiomyocyty exportován z buňky, zatímco exogenní laktát je nadále přijímán a oxidován v mitochondriích. Export laktátu spolu s exportem vznikajícího protonu předchází vývoji laktátové acidózy (obrázek 2.7; Essop, 2007).

Bylo popsáno, že v důsledku chronické hypoxie dochází k omezení energeticky náročných procesů jako exprese proteinů a aktivity pump, což umožní udržet dostatečnou hladinu ATP v buňce. Probíhají i další změny vedoucí k lepšímu využití ATP molekul (výměna těžkého řetězce α myozinu za těžký řetězec β , který má nižší ATPázovou aktivitu, snížení aktivity sarkolemálních ATPáz a zvýšení jejich afinity k ATP) (Ošťádal and Kolář, 2007).

Obrázek 2.7 - Schéma znázorňující pozorované změny energetického metabolismu v důsledku adaptace na chronickou hypoxii.



Obrázek znázorňuje rozdíly mezi buňkou v normoxickém prostředí (A) a buňkou adaptovanou na hypoxii (B). Během metabolické adaptace na hypoxii dochází jednak k energetické kompenzaci (B, horní část) a jednak k účinnějšímu využití kyslíku (B, spodní část). Kompenzace energie spočívá ve zvýšeném využívání glukózy (Glu) jako substrátu. Dochází ke zvýšení vstupu glukózy do buněk pomocí specifických transportérů (modrý válec). Glykolýza probíhá částečně anaerobně a poměr produkovaného ATP (žluté hvězdičky) v glykolýze vs. v oxidační fosforylaci (OXPHOS) stoupá po adaptaci na chronickou hypoxii zejména kvůli zvýšení aktivity kinázy pyruvátdehydrogenázy (PDK), která omezuje vstup pyruvátu (Pyr) produkovaného glykolýzou do Krebsova cyklu, a tedy omezuje vznik redukovaných koenzymů vstupujících do oxidační fosforylace. Pyruvát je tak ve větší míře přeměňován na laktát (Lac), během této reakce je NADH regenerováno na NAD⁺, které je nezbytné pro průběh glykolýzy. Vznikající laktát je exportován z buňky (žlutý válec). Při produkci laktátu se uvolňuje proton, který je z buňky exportován spolu s laktátem či speciálním přenašečem. Acidifikaci buňky dále brání vstup HCO₃⁻ do buněk. Dále dochází k výměně izoforem podjednotky COX-4 komplexu IV a k dalším změnám oxidační fosforylace, což vede k "šetření" kyslíkem. Tyto změny se spolu s omezenou produkcí redukovaných koenzymů v Krebsově cyklu zároveň účastní omezení produkce ROS. Jako alternativní akceptor elektronů může být namísto kyslíku použit fumarát. Dochází ke zvýšenému odstraňování mitochondrií procesem autofágie a zároveň je omezena mitochondriální biogeneze. Mi – mitochondrie; (převzato a upraveno z Aragonés et al., 2009)

2.4.2 Molekulární mechanismus a úloha mitochondrií v kardioprotekci vyvolané adaptací na chronickou hypoxii

Molekulární mechanismus vzniku kardioprotekce v důsledku chronické hypoxie není zcela objasněn, ale patrně sdílí některé kroky s preconditioningem, neboť efekty intermitentní hypobarické hypoxie (IHH) a preconditioningu se nesčítají (Neckář et al., 2002).

V důsledku adaptace na chronickou hypoxii byly popsány změny aktivit komplexů oxidační fosforylace, což může mít za následek změny produkce ROS. ROS se účastní IRI, při adaptaci na chronickou hypoxii jsou však pravděpodobně součástí signální kaskády vedoucí ke kardioprotekci. ROS se pravděpodobně účastní regulace transkripčních faktorů (např. HIF-1) či mitochondriálních kanálů účastnících se navození kardioprotekce. Potlačení oxidačního stresu v době adaptace vede k potlačení ochranného účinku (Kolář and Ošťádal, 2004; Kolář et al., 2007).

Další pravděpodobnou příčinou vyvolání kardioprotektivního účinku je zvýšená hladina NO, který je řazen mezi RNS a při jeho reakci se superoxidem vzniká peroxynitrit, který je pro buňku toxický. Stejně jako v případě ROS je NO potenciálně nebezpečná molekula, která však může spouštět kardioprotektivní efekty. V důsledku chronické hypoxie byla pozorována zvýšená exprese a aktivace NOS, čímž by mohlo docházet ke zvýšení koncentrace NO (Kolář and Ošťádal, 2004).

Hypoxie vede k aktivaci regulátorů transkripce, mezi které patří mimo již zmíněného transkripčního faktoru HIF-1 také p53, AP-1, NFκ-B, PPARα (receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů alfa) a další. HIF-1 reguluje velké množství genů (kolem 70) a účastní se kromě regulace metabolismu dalších dějů, jako je buněčná proliferace, angiogeneze a apoptóza (Essop, 2007).

Zdá se, že ochranného efektu adaptace na chronickou hypoxii se také účastní mitochondriální na ATP závislý draselný kanál (K_{ATP}), který je trvale aktivován (pozitivní zpětnou vazbou) po adaptaci na chronickou hypoxii a jeho zablokování vede k vyrušení protektivních efektů hypoxické adaptace. Účast druhého K_{ATP} kanálu, který se nachází na sarkolemě, je zatím sporná (Kolář and Ošťádal, 2004). Byly popsány změny aktivit dalších mitochondriálních kanálů, jako je BK_{Ca} (na vápníku závislý K^+ kanál) nebo MPTP

(mitochondriální pór přechodné permeability), v důsledku adaptace na chronickou hypoxii (Neckář et al., 2013; Zhu et al., 2006).

Přenosu signálu při utváření kardioprotektivního fenotypu se účastní také řada proteinkináz. Při preconditioningu hraje významnou roli proteinkináza C, která je pravděpodobně aktivována pomocí ROS a aktivace K_{ATP} kanálu. Role konkrétních proteinkináz při adaptaci na chronickou hypoxii není zatím zcela objasněna (Hlaváčková et al., 2010; Kolář and Ošťádal, 2004).

2.4.3 Kontinuální normobarická hypoxie

Adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii (CNH) poskytuje kardioprotektivní účinky. Ke snížení infarktu v důsledku CNH došlo po 15 dnech adaptace, přičemž zavedení krátkých expozic normoxických podmínek do protokolů adaptace tento kardioprotektivní efekt ruší. Potkani adaptovaní na CNH nevykazují zvýšený oxidační stres, ale mají zvýšené množství MnSOD, Cu/ZnSOD, katalázy a Prx (Neckář et al., 2013; Viganò et al., 2011).

Adaptace na CNH po dobu 10 dní vede ke snížení množství významných enzymů Krebsova cyklu (akonitáza, izocitrátdehydrogenáza, alfa-ketoglutarátdehydrogenáza, fumaráthydratáza) a enzymů účastnících se regulace beta-oxidace mastných kyselin (acyl-CoA dehydrogenáza, enoyl-CoA hydratáza). Snížení bylo popsáno také u některých podjednotek komplexů oxidační fosforylace (komplex I, flavoproteinová podjednotka komplexu II, několik podjednotek komplexu V) (Viganò et al., 2011). Hexokináza, jako rychlost limitující enzym glykolýzy, zvyšuje aktivitu v důsledku adaptace na hypoxické podmínky (14 dní) v obou komorách, ale výraznější změny nastaly v pravé komoře (RV). Oproti tomu aktivita laktátdehydrogenázy stejně jako aktivita COX nebyla hypoxií ovlivněna (Rumsey et al., 1999). Zároveň bylo pozorováno snížení mitofilinu, což poukazuje na změny struktury mitochondrií, neboť mitofilin je protein, který se účastní formování krist (Viganò et al., 2011).

U adaptovaných zvířat byla respirace se všemi substráty v LV snížena oproti normoxickým jedincům. Ke snížení došlo již po 24 hodinách hypoxických podmínek a pokles byl pozorován po dobu následujících 14 dní. Mezi 14. a 21. dnem zůstala respirace nízká (Rumsey et al., 1999). Ke snížení respirace však došlo jinak u subsarkolemálních

mitochondrii (SSM; těsně pod plazmatickou membránou) a u intermyofibrilárních mitochondrii (IFM; mezi kontraktilem aparátem). Změny na úrovni ETC byly pozorovány na SSM (snížení aktivit komplexů I, II a IV, což s sebou neslo snížení produkce ROS a toleranci k otevření MPTP). U IFM, kde tyto změny pozorovány nebyly, došlo ke snížení respirace pomocí snížení aktivity enzymu Krebsova cyklu - akonitázy, která protektivní vlivy nepřináší, což potvrzuje, že na protektivních účincích chronické hypoxie se účastní zejména SSM (Heather et al., 2012).

Po adaptaci na CNH (14 dní) byla popsána také zvýšená apoptóza v srdci a zvýšení množství HIF-1 α , které však v srdci, oproti jiným tkáním nebylo statisticky významné (Bianciardi et al., 2006). Gen pro protein vaskulární endoteliální růstový faktor A, který se účastní angiogeneze, byl jediný z 11 analyzovaných genů, které jsou pod působením HIF-1, který měnil svou hladinu v obou komorách, neboť bylo prokázáno, že LV a RV se liší regulací exprese v důsledku adaptace na CNH (Bohuslavová et al., 2010).

2.4.4 Adaptace na chronickou hypoxii u SHR

Normobarická hypoxie (10 % O₂; 3-7 týdnů) má antihypertenzní účinky. U adaptovaných potkanů SHR byl pozorován pokles krevního tlaku, který může souviset se zvýšenou angiogenezí pozorovanou v důsledku chronické hypoxie v kosterním i srdečním svalu. Nicméně po návratu do normoxických podmínek došlo k opětovnému zvýšení krevního tlaku, což znamená, že antihypertenzní efekt chronické hypoxie je pouze přechodný (Vilar et al., 2008). Oproti tomu u SHR potkanů adaptovaných na IHH (cca 5500 metrů nad mořem) po dobu 4 týdnů nebyly pozorovány změny krevního tlaku. Adaptovaní potkani SHR vykazovali pokles tělesné hmotnosti a hypertrofii RV (Chen et al., 1991). Adaptace potkanů SHR na chronickou hypoxii (10% O₂; 3 týdny) vede ke snížení velikosti infarktu a arytmií po akutní ischemii (Zajíčková, 2013).

2.4.5 Adaptace na chronickou hypoxii u SHR-mt^{BN}

Adaptace na chronickou hypoxii vede ke snížení velikosti infarktu a reperfúzních arytmií po akutní ischemii u konplastického kmene. Zatímco u kmene SHR dochází po adaptaci ke snížení počtu ischemických arytmií, na výskyt ischemických arytmií u konplastického kmene,

který se od kmene SHR liší pouze mitochondriálním genomem, neměla adaptace na chronickou hypoxii žádný vliv (Zajíčková, 2013).

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- charakterizovat konplastický kmen SHR-mt^{BN} s ohledem na vybrané parametry energetického metabolismu a antioxidační kapacity a srovnat tyto parametry s kontrolním kmenem SHR
- porovnat tyto parametry mezi skupinami potkanů SHR a SHR-mt^{BN} adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii a kontrolními normoxickými skupinami potkanů

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Použité chemikálie a jejich zdroje jsou shrnuty v tabulce 4.1. Chemikálie jsou ve všech roztocích rozpouštěny v redestilované vodě, pokud není uvedeno jinak.

Tabulka 4.1 - Použité chemikálie a jejich zdroj

<i>Zdroj</i>	<i>Název chemikálie</i>
Bio-Rad	BSA (hovězí sérový albumin) standard koncentrace 2 mg/ml
Fluka	TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin), DMSO (dimethylsulfoxid), askorbát
Lach-Ner	methanol, NaCl (chlorid sodný), sacharóza, KOH (hydroxid draselný), HCl (kyselina chlorovodíková)
Lachema	glycerol, persíran amonný, H ₂ O ₂ (peroxid vodíku), kyselina octová
Roche	koktejl inhibitorů proteáz - tablety
Sigma-Aldrich	NADH (nikotinamidadenindinukleotid), EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), oxalacetát, sukcinát, akrylamid/bis-akrylamid 30%, činidlo Bradfordové, DTT (dithiothreitol), SDS (dodecylsulfát sodný), Tween 20, luminol, kyselina p-kumarová, glycin, acetyl-CoA (acetyl-koenzym A), KH ₂ PO ₄ (dihydrogenfosforečnan draselný), NaCN (kyanid sodný), KCN (kyanid draselný), DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina), cytochrom c, BPB (bromfenolová modř), sukcinát, MgCl ₂ (chlorid hořečnatý), KCl (chlorid draselný), TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylendiamin), Ponceau S
USB Products	Tris (tris(hydroxymethyl)aminometan)

4.1.2 Laboratorní zvířata

Potkani byli získáni z oddělení Genetiky modelových onemocnění Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky, kde byl připraven konplastický kmen potkanů SHR-mt^{BN} (oficiální název SHR/OlaIpcv-mt^{BN/Crl}). Tento kmen vznikl nahrazením mitochondriálního genomu kmene SHR (SHR/OlaIpcv) mitochondriálním genomem kmene BN (BN/Crl), k čemuž bylo využito řízené křížení kmenů SHR a BN (Pravenec et al., 2007).

Potkani byli chováni při světelném režimu 12:12 a měli neomezený přístup k vodě a standardní laboratorní stravě (ST-1, Bergman, Česká Republika). Studie probíhala ve shodě s „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (National Academy of Science, National Academy Press, Washington, D.C.). Pro pokusy byli použiti samci ve stáří tři měsíců.

4.1.2.1 Experimentální model kontinuální normobarické hypoxie

Potkani SHR i SHRmt^{BN} byli rozděleni do dvou skupin, z nichž jedna skupina byla chována v normoxických podmínkách a druhá byla adaptovaná na CNH.

Kontinuální normobarická hypoxie 5500 m (CNH) – zvířata byla umístěna po dobu 21 dní nepřetržitě do hypoxických podmínek, kde byl obsah kyslíku snížen z hodnoty 21 % na 10 % pomocí generátoru hypoxie Everest Summit (Hypoxico Inc., NY, USA). Množství kyslíku během adaptace odpovídalo množství kyslíku v nadmořské výšce 5500 m, zatímco celkový atmosferický tlak byl ponechán na běžných hodnotách, tedy cca 99 kPa (odpovídá nadmořské výšce 200 m). Během adaptace byla udržována teplota mezi 21 - 23 °C a byla zajištěna cirkulace vzduchu.

Normoxie – skupina zvířat byla po dobu 21 dní chována v běžných normoxických podmínkách (atmosferický tlak 99 kPa, množství kyslíku 21 %) při teplotě 21 - 23 °C.

4.1.2.2 Odběr tkáně

Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací. Srdce bylo vyjmuto, propláchnuto ve vychlazeném fyziologickém roztoku (0 °C) a rozděleno na levou komoru (LV), pravou komoru (RV) a septum. Všechny části srdce byly zváženy, ihned zamraženy v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

4.2 Metody

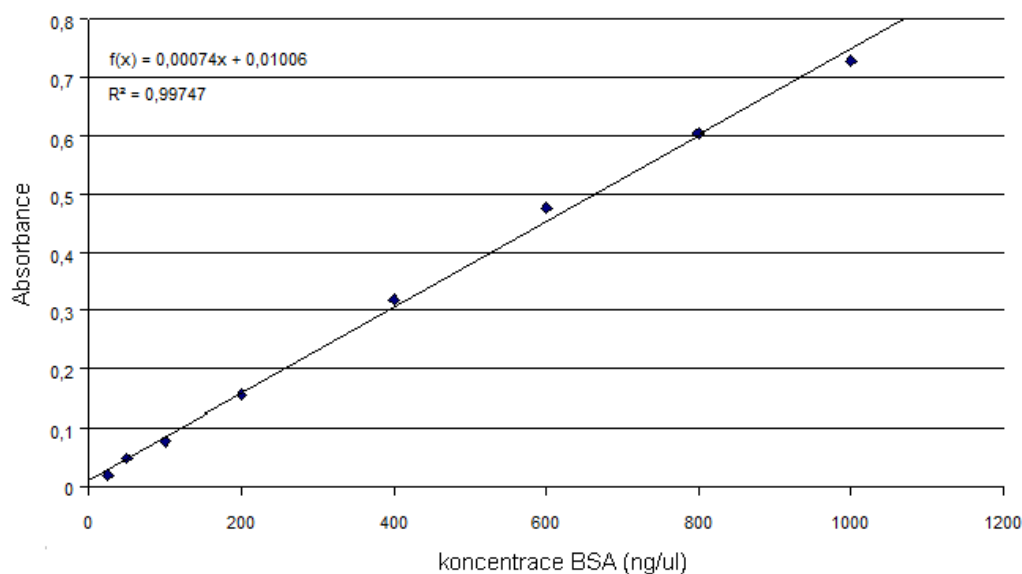
4.2.1 Homogenizace tkáně

Vzorky srdeční tkáně (LV) byly vyjmuty z tekutého dusíku. Tkáň byla rozmrazena ve vychlazeném homogenizačním pufru (0,250 M sacharóza, 0,020 M Tris, 0,001 M EDTA, pH 7,4), poté byla rozstříhána pomocí nůžek na kousky o délce strany cca 1 mm. Následně byla suspenze homogenizována homogenizátorem typu Potter-Elvehjem (10 tahů teflonovým pístem otáčejícím se 1300 rpm). Vzniklý homogenát byl filtrován přes 3 vrstvy gázy a následně opět homogenizován skleněným homogenizátorem typu Tenbroeck. Výsledkem byl desetiprocentní homogenát.

Pro imunodetekci byl ke vzorkům přidán koktejl inhibitorů proteáz dle návodu výrobce (Roche - Protease inhibitor cocktail tablets – širokospektrá směs inhibitorů pro inhibici metaloproteáz, serinových a cysteinových proteáz). Během všech kroků byly vzorky chlazeny ledem.

4.2.2 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena metodou dle Bradfordové (Bradford, 1976) na 96jamkových destičkách pomocí fluorometru Varioskan (Thermo Scientific). Jako blank byla použita redestilovaná voda. Jako standard byl použit BSA v koncentracích 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/μl. Změřená absorbance standardu byla vynesena do grafu a sloužila jako kalibrační křivka (obrázek 4.1). Objem 10 μl blanku, standardů, či vhodně naředěného vzorku byl 10 min inkubován s 250 μl činidla Bradfordové. Následně byla změřena absorbance a pomocí kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace proteinů ve stanovovaných vzorcích. Stanovení bylo prováděno v šesti alikvotech od každého vzorku, každé měření bylo prováděno v tripletech.

Obrázek 4.1 - Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové

BSA – hovězí sérový albumin; R^2 – koeficient determinace; $f(x)$ – rovnice regresní přímky

4.2.3 Spektrofotometrické měření enzymových aktivit

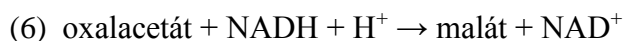
Enzymové aktivity byly měřeny spektrofotometricky (Shimadzu UV-1650) za pokojové teploty v jednorázových kyvetách pro spektrofotometrii (P-lab) v objemu 1 ml. Měření bylo prováděno v tripletech. Získané hodnoty změny absorbance byly vyjádřeny jako specifická enzymová aktivita dle Lambert-Beerova zákona:

$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ (kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient, c je koncentrace a l je tloušťka kyvety)

Aktivity byly vztaženy na mg proteinu a jsou udávány v jednotkách $\mu\text{mol/min/mg}$ proteinu.

4.2.3.1 Malátdehydrogenáza

Aktivita MDH byla měřena jako pokles absorbance při 340 nm způsobený oxidací přidaného NADH dle protokolu uvedeného v tabulce 4.2. Probíhající reakci popisuje následující rovnice:



Pro výpočet aktivit byl použit molární absorpční koeficient $\epsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

Tabulka 4.2 - Protokol pro stanovení aktivity malátdehydrogenázy

Malátdehydrogenáza

chemikálie *množství v reakci*

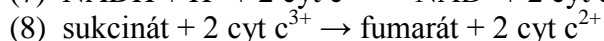
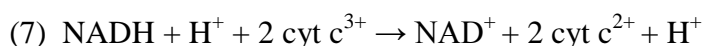
KP pufr (100 mM, pH 7,4)	965 μl
Vzorek	5 μl
NADH (15,1 mM)	20 μl
-----	Start
Oxalacetát (151 mM)	10 μl

*Zkratky chemikálií jsou vysvětleny v tabulce 4.1; KP pufr – draselno-fosfátový pufr
vzorek - 10% homogenát o koncentraci proteinů 5 – 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$*

Pozn.: oxalacetát je třeba připravit vždy čerstvý

4.2.3.2 NADH-cytochrom c oxidoreduktáza a sukcinát-cytochrom c oxidoreduktáza

Aktivita NADH-cytochrom c oxidoreduktázy a sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy byla měřena jako změna absorbance při 550 nm, která odráží redukci cytochromu c. NADH-cytochrom c oxidoreduktáza (rovnice 7) a sukcinát-cytochrom c oxidoreduktáza (rovnice 8) katalyzují reakce, při kterých je jejich substrát oxidován za současné redukce cytochromu c. Přenos elektronů z cytochromu c na kyslík pomocí COX, a tedy opětovná oxidace cytochromu c byla inhibována přidáním kyanidu. Protokol pro stanovení aktivity NADH-cytochrom c oxidoreduktázy a sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy je uveden v tabulce 4.3.



cyt c – cytochrom c

Pro výpočet aktivit byl použit molární absorpční koeficient $\epsilon_{550} = 19,1 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

Tabulka 4.3 - Protokol pro stanovení aktivit NADH-cytochrom c oxidoreduktázy a sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy**NADH-cytochrom c oxidoreduktáza***chemikálie**množství v reakci*

KP pufr (100 mM, pH 7,4)	940 µl
Cytochrom c (8,1 mM)	10 µl
NaCN (5 mM)	10 µl
Vzorek	20 µl
-----	Start
NADH (15,1 mM)	20 µl

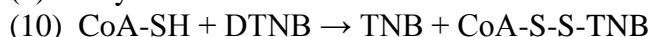
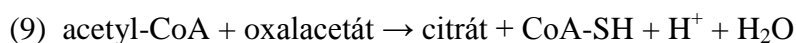
Sukcinát-cytochrom c oxidoreduktáza*chemikálie**množství v reakci*

KP pufr (100 mM, pH 7,4)	940 µl
Cytochrom c (8,1 mM)	10 µl
NaCN (5 mM)	10 µl
Vzorek	20 µl
-----	Start
Sukcinát (500 mM)	20 µl

*Zkratky chemikálií jsou vysvětleny v tabulce 4.1; KP pufr – draselno-fosfátový pufr
vzorek - 10% homogenát o koncentraci proteinů 5 – 10 µg/µl*

4.2.3.3 Citrátsyntáza

Aktivita CS byla stanovena jako změna absorbance při 412 nm. CS katalyzuje reakci mezi acetyl-CoA a oxalacetátem za vzniku citrátu a CoA (rovnice 9). Skupina -SH na CoA reaguje s DTNB za vzniku TNB (5-thio-2-nitrobenzoová kyselina) (rovnice 10). TNB je žlutě zbarvená látka, jejíž přítomnost stanovujeme spektrofotometricky při 412 nm, čímž je nepřímo stanovena aktivita CS. Oxalacetát byl k reakci přidán až po cca 30 s, případné pozadí naměřené v tomto intervalu bylo od výsledné aktivity odečteno. Protokol pro stanovení aktivity CS je uveden v tabulce 4.4.



Pro výpočet aktivit byl použit molární absorpční koeficient $\epsilon_{412} = 13,6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

Tabulka 4.4 - Protokol pro stanovení aktivity citrátsyntázy**Citrátsyntáza***chemikálie**množství v reakci*

Tris-HCl pufr (100 mM, pH 8,1)	920 μ l
Vzorek	10 μ l
Acetyl-CoA (12,2 mM)	10 μ l
DTNB (10,1 mM)	10 μ l
-----	Start
Oxalacetát (10 mM)	50 μ l

Zkratky chemikálií jsou vysvětleny v tabulce 4.1

vzorek - 10% homogenát o koncentraci proteinů 5 – 10 μ g/ μ l

Pozn.: Acetyl-CoA byl rozpuštěn ve vodě, oxalacetát a DTNB v Tris-HCl pufru; DTNB a oxalacetát je třeba připravit vždy čerstvě

4.2.4 Měření spotřeby kyslíku

Pro měření spotřeby kyslíku byla použita respirometrie s vysokým rozlišením pomocí polarografického senzoru kyslíku za použití přístroje Oxygraph-2k od firmy OROBOROS.

Měření bylo prováděno v objemu 2 ml při 30 °C a za neustálého míchání (750 rpm). Koncentrace kyslíku byla zaznamenávána každé 2 s pomocí softwaru DatLab 5. Substráty byly přidávány pomocí mikrostříkačky Hamilton.

Pomocí měření spotřeby kyslíku byla stanovena aktivita COX.

4.2.4.1 Stanovení aktivity cytochrom c oxidázy

Aktivita COX byla stanovena jako spotřeba kyslíku za použití umělého donoru elektronů TMPD. TMPD předává elektrony na cytochrom c, který je oxidován pomocí COX za spotřeby molekulárního kyslíku. Regenerace redukováného TMPD byla zajištěna přidáním askorbátu. Aktivita COX byla stanovena jako kyanid senzitivní složka respirace s TMPD a askorbátem (Barrientos et al., 2009). Protokol pro stanovení aktivity COX je uveden v tabulce 4.5.

Spotřeba kyslíku byla vztažena na mg proteinu a je udávána v jednotkách pmol O₂/s/mg proteinu.

Tabulka 4.5 - Protokol pro stanovení aktivity cytochrom c oxidázy**Cytochrom c oxidáza***chemikálie**množství v reakci*

Respirační pufr (0,08 M KCl, 0,01 M Tris, 5 mM KH ₂ PO ₄ , 3 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, pH 7,2)	2 ml
Vzorek	5 µl
Askorbát (1 M)	10 µl
TMPD (0,1 M)	20 µl
KCN (5 mM)	5 µl

*Zkratky chemikálií jsou vysvětleny v tabulce 4.1**vzorek - 10% homogenát o koncentraci proteinů 5 – 10 µg/µl***4.2.5 SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE slouží pro rozdělení proteinů v gelu pomocí elektrického pole. Proteiny jsou denaturovány SDS, který udílí proteinům náboj odpovídající jejich velikosti, proto dělení probíhá především dle velikosti proteinu.

Elektroforéza byla provedena s příslušenstvím Mini-PROTEAN® 3 Cell od firmy Bio-Rad dle manuálu (Bio-Rad, Mini-PROTEAN® 3 Cell, Instruction Manual).

4.2.5.1 Příprava gelů

Roztok pro dělicí gel byl připraven dle tabulky 4.6. Jeho koncentrace závisela na stanovovaném proteinu (tabulka 4.7). Tento roztok byl nalit mezi skla aparatury na nalévání gelů cca 1,5 cm pod okraj a převrstven redestilovanou vodou (rozměry gelu: 65 x 85 x 0,75 mm). Polymerace gelu trvala cca 45 min. Následně byla redestilovaná voda odsáta pomocí filtračního papíru a gel byl převrstven startovacím gelem (4%; tabulka 4.6), do něhož byl zanořen hřebínek pro vytvoření jamek na nanášení vzorku. Startovací gel polymeroval cca 20 min. Následně byly vzniklé jamky promyty redestilovanou vodou, gely se skly byly přeneseny do elektroforetické vany, která byla vyplněna vychlazeným elektrodoým pufr (0,025 M Tris, 0,192 M glycín, 0,0035 M SDS).

Tabulka 4.6 - Složení polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE. Startovací gel (4%) a dělicí gely (dle stanovovaného proteinu viz tabulka 4.7.)

chemikálie	typ a koncentrace gelu			
	startovací	dělicí		
	4%	10%	12%	15%
30% (w/v) akrylamid/bis-akrylamid	0,65 ml	3,32 ml	3,98 ml	3,75 ml
Roztok 1,5 M Tris-HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8	X	2,49 ml	2,49 ml	1,875 ml
Roztok 0,5 M Tris-HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8	1,25 ml	X	X	X
redestilovaná voda	3,05 ml	4,15 ml	3,49 ml	1,875 ml
TEMED	0,005 ml	0,007 ml	0,007 ml	0,005 ml
10% (w/v) persíran amonný	0,05 ml	0,07 ml	0,07 ml	0,05 ml

Zkratky chemikálií jsou vysvětleny v tabulce 4.1

Pozn.: uvedená množství odpovídají přípravě 2 gelů

4.2.5.2 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Vzorky s přidáními inhibitory proteáz (viz kapitola 4.2.1) byly rozmrazeny a naředěny vzorkovým pufrům (0,125 M Tris, 20% (v/v) glycerol, 0,001% (w/v) BPB, 4% (w/v) SDS, 0,05 M DTT, pH 6,8) na koncentraci vyplývající z požadované nanášky (μg proteinu) a maximálního objemu jamky v gelu (15 μl). Takto naředěné vzorky byly umístěny do bločku vyhrátého na 100 °C po dobu 3 min. Následně byly vzorky centrifugovány (30 s; 8000 g).

4.2.5.3 Elektroforéza

Připravené vzorky byly naneseny na gel pomocí pipety s nanášecími špičkami. Objem vzorku byl přizpůsoben požadovanému množství nanášeného proteinu (tabulka 4.7) a byl vypočítán ze stanovené koncentrace proteinů. Na gel byl dále nanesen vhodný marker molekulových hmotností (tabulka 4.8), případně pozitivní kontrola (Cu/ZnSOD – homogenát mozku potkana; kataláza – homogenát jater potkana; Total OXPHOS, MTCO1 – izolované srdeční mitochondrie potkana).

Aparatura byla následně připojena na zdroj stejnosměrného napětí (400 V). Elektroforéza probíhala při režimu konstantního proudu, který byl nastaven na 10-15 mA/gel pro zanoření

proteinů do gelu (cca prvních 10 min) a následně byl zvýšen na 20-30 mA/gel (hodnoty proudu se lišily dle použitého gelu a dle stanovovaného proteinu – tabulka 4.7). Doba trvání elektroforézy se pohybovala mezi 40 a 70 min.

Po ukončení elektroforézy byly gely vyňaty z prostoru mezi skly a byly umístěny do plastové misky s vychlazeným transferovým pufrům (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20% (v/v) metanol, pH 8,3). Gely zde byly ponechány po dobu cca 5 min.

Tabulka 4.7 - Přehled proteinů stanovovaných Western blotem.

	<i>Nanáška (μg proteinu)</i>	<i>Koncentrace gelu</i>	<i>Proud (mA)/gel</i>
MnSOD	1	15%	15 → 30
Cu/ZnSOD	4	15%	15 → 30
Kataláza	25	10%	10 → 25
Total OXPHOS	5	12%	10 → 25
MTCO1	5	10%	10 → 20

MnSOD – manganová superoxiddismutáza; Cu/ZnSOD – měď-zinková superoxiddismutáza; Total OXPHOS – směs protilátek proti podjednotkám oxidační fosforylace; MTCO1 – podjednotka komplexu IV oxidační fosforylace

Tabulka 4.8 - Přehled používaných markerů molekulových hmotností a jejich zdrojů.

<i>zdroj</i>	<i>název</i>	<i>Rozsah (kDa)</i>
Bio-Rad	Širokospektrý molekulový marker (SDS-PAGE standard, broad range)	7,1 – 209
Bio-Rad	Kaleidoskopický standard (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standard)	10 – 250
Sigma-Aldrich	Marker molekulových hmotností (Prestained Molecular Weight Marker)	26,6 – 180

4.2.6 Western blot

K přenosu proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu byla použita metoda Western blot (Towbin et al., 1979) na aparatuře AmershamTM.

Pro elektropřenos byl sestaven “sendvič“ obsahující gel, nitrocelulózovou membránu (Amersham HybondTM-C), papír na blotování (QuickDrawTM) a pěnové polštářky. Všechny součásti “sendviče“ byly namočený v transferovém pufru a byly na sebe poskládány v pořadí pěnový polštářek – papír – gel – membrána – papír – pěnový polštářek tak, aby mezi jednotlivými vrstvami nebyly vzduchové bubliny. Následně byly obklopeny plastovou kazetou, která byla převázána pomocí gumiček. “Sendvič“ byl umístěn do elektropřenosové vany naplněné transferovým pufrem tak, aby membrána směřovala k anodě a gel ke katodě. Elektropřenosová vana byla připojena na zdroj stejnosměrného napětí, který byl nastaven na 100 V a 350 mA. Elektropřenos probíhal po dobu 1 hodiny. Poté byla membrána vyňata a byla provedena kontrola přenosu obarvením membrány v roztoku Ponceau S (0,1% (w/v) Ponceau S v 1% (v/v) kyselině octové). Membrána byla následně opláchnuta redestilovanou vodou a umístěna do plastové krabičky naplněné pufrem TTBS (solný roztok pufovaný Tris s Tweenem-20: 0,02 M Tris, 0,5 M NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,5).

4.2.7 Imunodetekce

Imunodetekce vybraných proteinů na membráně byla prováděna nepřímo za pomoci primární protilátky a sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (HRP) dle protokolu Amersham (ECL Western blotting detection reagents and analysis system) v plastové misce Sterilin[®] o rozměrech 10 x 10 cm.

Membrána byla nejprve blokována v 5% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TTBS (objem 50 ml) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě na laboratorní kývačce. Poté byla membrána promyta 3x čerstvým TTBS vždy po 5 min míchání na kývačce. Po promytí byla přidána vhodně naředěná primární protilátka v TTBS (objem 10 ml; seznam použitých primárních protilátek včetně jejich zdroje a ředění je uveden v tabulce 4.9). Membrána byla v primární protilátce ponechána 1,5 hodiny za stálého míchání na kývačce (MnSOD, Cu/ZnSOD, kataláza), nebo přes noc při teplotě 4 °C (Total OXPHOS, MTCO1). Poté byla membrána opět promyta 3x po 5 min čerstvým TTBS. Následně byla k membráně přidána

vhodně naředěná sekundární protilátka v TTBS (objem 20 ml) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě za stálého míchání na kývačce (seznam použitých sekundárních protilátek včetně jejich zdroje a ředění je uveden v tabulce 4.9). Následně byla membrána promyta 3x po 5 min čerstvým TTBS a v roztoku TTBS byla ponechána v lednici přes noc.

Tabulka 4.9 - Seznam použitých protilátek a jejich zdrojů

Primární protilátky

<i>Zdroj</i>	<i>Název</i>	<i>Typ</i>	<i>Ředění</i>
Abcam	protilátka proti MTCO1	myši monoklonální	1:1000
Abcam	MitoProfile® koktejl protilátek Total OXPHOS	myši monoklonální	1:250
Abcam	protilátka proti kataláze	králíčí polyklonální	1:2000
Cayman Chemical	protilátka proti MnSOD	králíčí polyklonální	1:2000
Cayman Chemical	protilátka proti Cu/ZnSOD	králíčí polyklonální	1:2000
Santa Cruz Biotechnology	protilátka proti GAPDH	králíčí polyklonální	1:5000

Sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (HRP)

Sigma-Aldrich	protilátka proti králíčím protilátkám	z kozího antisera	1:3000
Santa Cruz Biotechnology	protilátka proti myším protilátkám	z antisera skotu	1:10000

MnSOD – manganová superoxiddismutáza; Cu/ZnSOD – měď-zinková superoxiddismutáza; Total OXPHOS – směs protilátek proti podjednotkám oxidační fosforylace; MTCO1 – podjednotka komplexu IV oxidační fosforylace; GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

4.2.8 Metoda zesílené chemiluminiscence (ECL)

K detekci signálu z imunodetekce byla použita metoda zesílené chemiluminiscence, která umožňuje detekovat HRP. HRP katalyzuje oxidaci luminolu za současné emise světla. Tento signál je zesílen a prodloužen v přítomnosti fenolů (Thorpe et al., 1985). Emitované světlo má vlnovou délku 428 nm, a je tedy možné ho zachytit na autoradiografický či rentgenový film.

Membrána byla vyjmuta z roztoku TTBS a okapána od zbytku roztoku. Vyvolávací roztoky (tabulka 4.10; Mruk and Cheng, 2011) byly smíchány v poměru 1:1. Po promíchání byla směs (objem 3 ml) nalita rovnoměrně na membránu (na stranu s navázanými proteiny). Směs byla na membráně ponechána po dobu 1 min, následně byla membrána okapána od zbytků směsi a umístěna do čirých eurodesek tak, aby mezi membránou a deskami nebyly vzduchové bubliny. Membrána v deskách byla umístěna do expoziční kazety a v temné místnosti byl na membránu přiložen autoradiografický film (Medical X-ray film blue, Agfa), kazeta byla zatížena. Po vhodné době expozice, která byla pro každý protein vyzkoušena, byl exponovaný film vyvolán pomocí vyvolávacího přístroje (Fomei Optima X-Ray Film Procesor od firmy Protec Medizintechnik GmbH & Co. KG.).

Tabulka 4.10 - Složení vyvolávacích roztoků

roztok chemikálie a jejich množství

1	0,1 M Tris, pH 8,8 + 0,5 ml 0,25 M luminolu v DMSO + 220 μ l 90 mM p-kumarové kyseliny v DMSO
2	5,4 mM H ₂ O ₂ v 0,1 M Tris, pH 8,8

Zkratky chemikálií jsou vysvětleny v tabulce 4.1

4.2.9 Vyhodnocení signálu z filmů

Filmy byly skenovány stolním skenerem Epson Perfection 1240 U s rozlišením 300 dpi (typ obrazu: black & white photo). Oskanované obrázky byly uloženy jako nekomprimovaný soubor TIFF. Vyhodnocení dat bylo provedeno manuálně v programu ImageQuant™ TL. Získané hodnoty (denzitometrické objemy) byly vztaženy na 1 μ g proteinu a přepočítány na arbitrární jednotky, které vyjadřují procentuální zastoupení jednotlivých experimentálních skupin (za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů všech 4 experimentálních skupin). Denzitometrické objemy vzorků odpovídajících si skupin byly hodnoceny vždy z jednoho filmu. Distribuce glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) byla použita jako vnitřní kontrola změn sledovaných proteinů.

4.2.10 Zpracování dat

Výpočty byly prováděny v programu Microsoft Excel 2010. Statistická analýza dat a jejich grafické znázornění bylo provedeno pomocí programu GrafPad Prism 5. Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (S.E.M.). Pro statistické vyhodnocení byla použita jednocestná analýza (ONE WAY ANOVA) a Newman-Keulsův test. Jako statisticky významný rozdíl byl vyhodnocen rozdíl na hladině významnosti 5 % ($p < 0,05$).

5 Výsledky

5.1 Hmotnostní parametry

Hmotnostní parametry byly získány na Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR během zabíjení potkanů. Hmotnosti těla a jednotlivých částí srdcí potkanů kmene SHR a konplastického kmene (SHR-mt^{BN}) chovaných v normoxických podmínkách a adaptovaných na chronickou hypoxii jsou uvedeny v tabulce 5.1.

Hmotnost těla se neliší mezi kmeny a je signifikantně nižší u potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii (u SHR 82,4 % a u konplastického kmene 81,5 %) ve srovnání s normoxickými kontrolami.

Hmotnost RV se neliší mezi kmeny za normoxických podmínek a u obou kmenů se po adaptaci na chronickou hypoxii zvyšuje (u SHR na 197 % a u konplastického kmene na 192,5 %) vůči normoxickým kontrolám. Po adaptaci na hypoxii je však hmotnost RV u konplastického kmene významně nižší (93 %) ve srovnání s SHR. Relativní hmotnost RV (hmotnost RV/hmotnost těla) je u adaptovaných potkanů signifikantně vyšší (u SHR 239 % a u konplastického kmene 233,9 %) než u normoxických kontrol.

Hmotnost LV se neliší mezi kmeny, ani se nemění po adaptaci na chronickou hypoxii. Relativní hmotnost LV (hmotnost LV/hmotnost těla) je však signifikantně vyšší po adaptaci na chronickou hypoxii (u SHR 115,5 % a u konplastického kmene 117,8 %) ve srovnání s normoxickými kontrolami. Pokud jde o srovnání mezi oběma kmeny, relativní hmotnost LV je po adaptaci na hypoxii mírně, ale signifikantně vyšší u konplastického kmene (104 %) než u SHR.

Hmotnost septa se neliší mezi kmeny a je statisticky významně nižší po adaptaci na chronickou hypoxii u konplastického kmene (89 %), zatímco u kmene SHR je snížení nesignifikantní.

Tabulka 5.1 - Hmotnostní parametry SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii

	SHR		SHR-mt ^{BN}	
	normoxie	hypoxie	normoxie	hypoxie
Hmotnost těla (g)	329,6 ± 3,390	271,7 ± 2,562 *	320,9 ± 5,671	261,5 ± 10,63 *
Hmotnost RV (mg)	200,2 ± 3,699	394,4 ± 6,628 *	190,9 ± 4,045	367,5 ± 8,657 * #
Hmotnost LV (mg)	627,1 ± 4,970	597,2 ± 7,490	624,5 ± 15,99	607,7 ± 20,02
Hmotnost septa (mg)	243,0 ± 5,639	226,3 ± 4,539	251,6 ± 8,268	225,0 ± 7,958 *
Hmotnost LV/těla	1,904 ± 0,0211	2,199 ± 0,0229 *	1,945 ± 0,0308	2,292 ± 0,0371 * #
Hmotnost RV/těla	0,6071 ± 0,0083	1,453 ± 0,0273 *	0,5952 ± 0,0093	1,392 ± 0,0461 *

RV – pravá komora; LV – levá komora; SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway)

hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=10

*statisticky významné rozdíly jsou označeny: * P<0.05 vs. odpovídající normoxická skupina; # P<0.05 vs. odpovídající skupina SHR*

5.2 Aktivita enzymů

Byly stanoveny aktivity CS, MDH, NADH-cytochrom c oxidoreduktázy, sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy a COX. Aktivity byly měřeny spektrofotometricky, nebo jako spotřeba kyslíku pomocí oxygrafu (viz kapitola 4.2).

5.2.1 Enzymy Krebsova cyklu

Z enzymů účastnících se Krebsova cyklu byla stanovena aktivita CS a MDH.

5.2.1.1 Citrátsyntáza

Výsledky měření aktivity CS jsou prezentovány v tabulce 5.2 a v grafu 5.1.

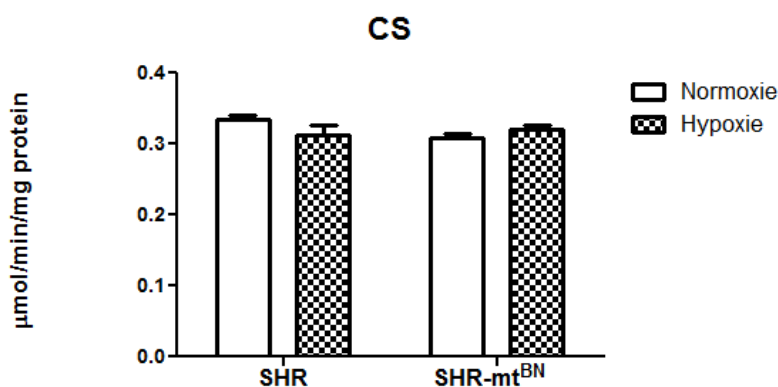
V enzymatické aktivitě CS nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi SHR a konplastickým kmenem ani nebyl pozorován žádný vliv adaptace na hypoxii.

Tabulka 5.2 - Aktivita citrátsyntázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii

Citrátsyntáza (μmol/min/mg protein)		
	Normoxie	Hypoxie
SHR	0,3345 ± 0,006788	0,3128 ± 0,01297
SHR-mt ^{BN}	0,3075 ± 0,006362	0,3204 ± 0,006097

SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway)
hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=10

Graf 5.1 - Aktivita citrátsyntázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); CS - citrátsyntáza
Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S.E.M.; n=10

5.2.1.2 Malátdehydrogenáza

Výsledky měření aktivity MDH jsou zaznamenány v tabulce 5.3 a v grafu 5.2.

Za normoxických podmínek se aktivita MDH mezi kmeny neliší. Aktivita signifikantně klesá (o 23 %) po adaptaci na chronickou hypoxii pouze u SHR kmene. Protože adaptace na hypoxii neměla žádný vliv na aktivitu MDH u konplastického kmene, pozorujeme mezi oběma kmeny po adaptaci signifikantní rozdíl mezi SHR a konplastickým kmenem (u SHR-mt^{BN} cca 1,5x vyšší aktivita než u SHR).

Tabulka 5.3 - Aktivita malátdehydrogenázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii

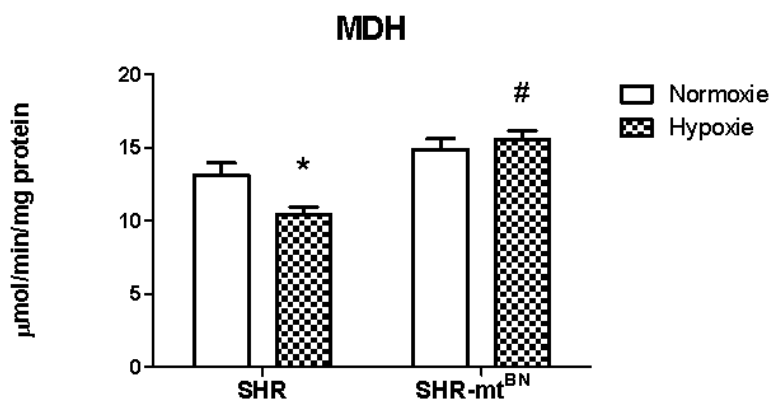
Malátdehydrogenáza (μmol/min/mg protein)		
	Normoxie	Hypoxie
SHR	13,14 ± 0,8331	10,09 ± 0,5656 *
SHR-mt ^{BN}	14,9 ± 0,7026	15,53 ± 0,6386 #

SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway)

hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=8

statisticky významné rozdíly jsou označeny: * P<0.05 vs. odpovídající normoxická skupina; # P<0.05 vs. odpovídající skupina SHR

Graf 5.2 - Aktivita malátdehydrogenázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); MDH - malátdehydrogenáza

Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S.E.M.; n=8

statisticky významné rozdíly jsou označeny: * P<0.05 vs. odpovídající normoxická skupina; # P<0.05 vs. odpovídající skupina SHR

5.2.2 Enzymy oxidační fosforylace

Byla měřena aktivita komplexů I a III jako NADH-cytochrom c oxidoreduktáza. Enzymatická aktivita komplexů II a III byla stanovena jako sukcinát-cytochrom c oxidoreduktáza. Dále byla měřena aktivita komplexu IV (COX).

5.2.2.1 NADH-cytochrom c oxidoreduktáza

Výsledky měření aktivity NADH-cytochrom c oxidoreduktázy (komplexů I a III oxidační fosforylace) jsou zaznamenány v tabulce 5.4 a v grafu 5.3.

V enzymatické aktivitě NADH-cytochrom c oxidoreduktázy nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi SHR a konplastickým kmenem ani žádná změna po adaptaci na hypoxii.

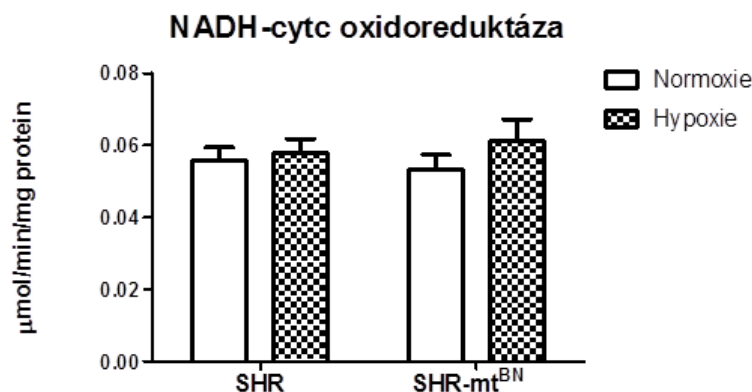
Tabulka 5.4 - Aktivita NADH-cytochrom c oxidoreduktázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii

NADH-cytochrom c oxidoreduktáza (μmol/min/mg protein)		
	Normoxie	Hypoxie
SHR	0,05558 ± 0,003740	0,05791 ± 0,003782
SHR-mt ^{BN}	0,05321 ± 0,004150	0,06095 ± 0,006255

SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway)

hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=10

Graf 5.3 - Aktivita NADH-cytochrom c oxidoreduktázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); NADH-cyt c oxidoreduktáza – NADH-cytochrom c oxidoreduktáza

Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S.E.M.; n=10

5.2.2.2 Sukcinát-cytochrom c oxidoreduktáza

Výsledky měření aktivity sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy (neboli komplexů II a III oxidační fosforylace) jsou zaznamenány v tabulce 5.5 a v grafu 5.4.

Aktivita sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy se neměnila po adaptaci na hypoxii a nebyl zaznamenán ani rozdíl v aktivitě mezi SHR a konplastickým kmenem.

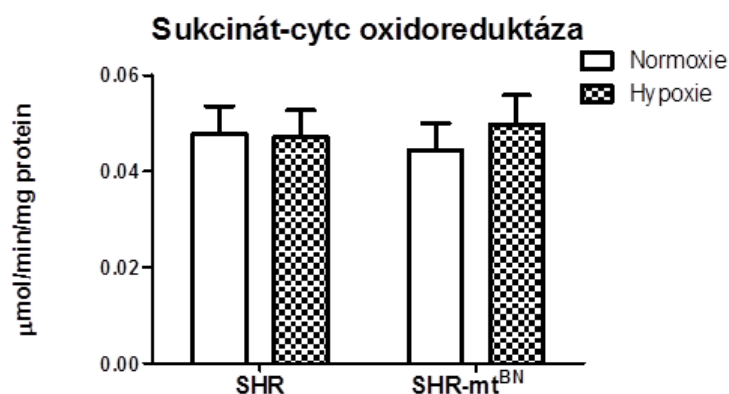
Tabulka 5.5 - Aktivita sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii

Sukcinát-cytochrom c oxidoreduktáza (μmol/min/mg protein)		
	Normoxie	Hypoxie
SHR	0,04774 ± 0,005743	0,04713 ± 0,005553
SHR-mt ^{BN}	0,04441 ± 0,005576	0,04969 ± 0,006093

SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway)

hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=10

Graf 5.4 - Aktivita sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); Sukcinát-cytc oxidoreduktáza – sukcinát-cytochrom c oxidoreduktáza

Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S.E.M.; n=10

5.2.2.3 Cytochrom c oxidáza

Aktivity COX (komplex IV oxidační fosforylace) měřené jako spotřeba kyslíku na kyslíkové elektrodě (viz kapitola 4.2) jsou zaznamenány v tabulce 5.6 a v grafu 5.5.

Mezi kmenem SHR a konplastickým kmenem nebyl zaznamenán žádný rozdíl ve spotřebě kyslíku. U SHR kmene stejně jako u kmene konplastického aktivita COX mírně klesá po adaptaci na chronickou hypoxii (SHR na 88 %; konplastický kmen na 89 %), tento pokles však nedosáhl statistické významnosti.

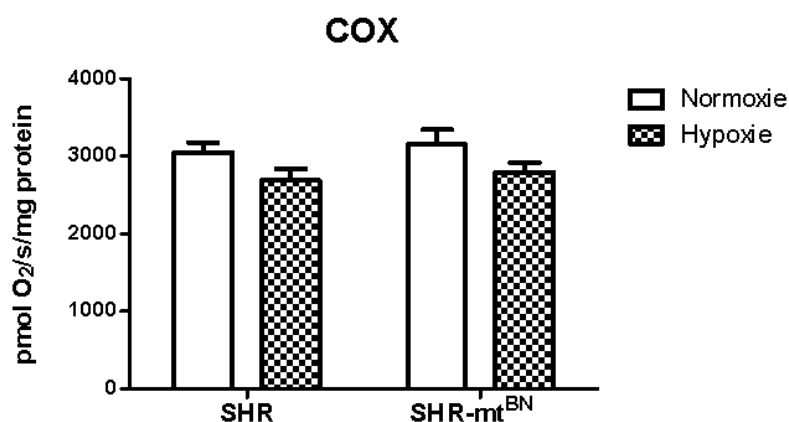
Tabulka 5.6 - Aktivita cytochrom c oxidázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii

Cytochrom c oxidáza (pmol O ₂ /s/mg protein)		
	Normoxie	Hypoxie
SHR	3052 ± 122,2	2685 ± 155,0
SHR-mt ^{BN}	3148 ± 192,7	2794 ± 126,1

SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway)

hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=9

Graf 5.5 - Aktivita cytochrom c oxidázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); COX – cytochrom c oxidáza

Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S.E.M.; n=9

5.3 Množství proteinu

Množství proteinu bylo stanovováno metodou Western blotu a následné imunodetekce (viz kapitola 4.2). Byly stanoveny vybrané antioxidační enzymy a některé podjednotky komplexů oxidační fosforylace.

5.3.1 Antioxidační enzymy

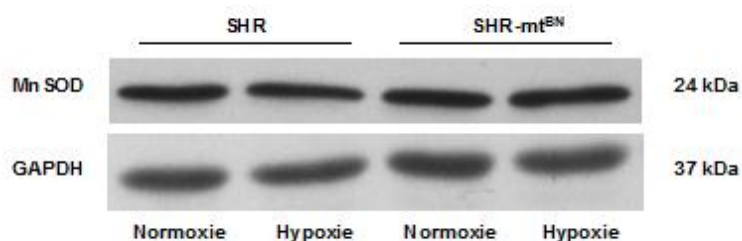
Z antioxidačních enzymů bylo stanoveno množství proteinu MnSOD, Cu/ZnSOD a katalázy.

5.3.1.1 MnSOD

Na obrázku 5.1 je reprezentativní obrázek Western blotu MnSOD. Stanovené množství MnSOD je prezentováno v tabulce 5.7 a v grafu 5.6.

Mezi kmeny SHR a SHR-mt^{BN} není rozdíl v množství MnSOD. U SHR je po hypoxii klesající trend (90 %), který však není statisticky významný. U konplastického kmene se množství MnSOD po hypoxii nemění.

Obrázek 5.1 - Reprezentativní obrázek Western blotu MnSOD a GAPDH (kontrolní protein)



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); MnSOD – manganová superoxiddismutáza; GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

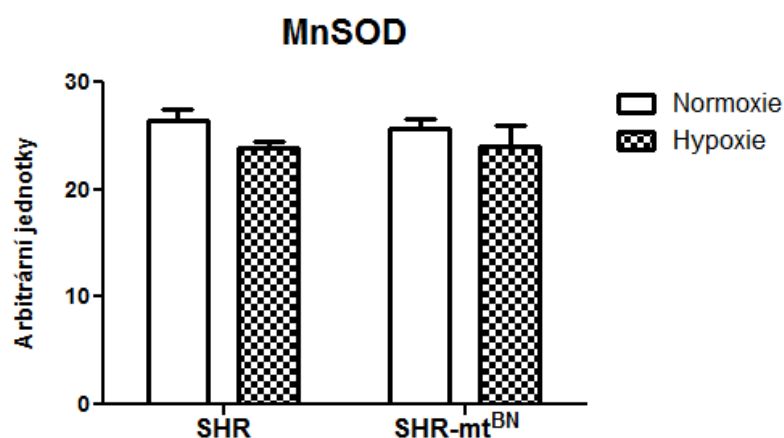
vpravo jsou uvedeny přibližné molekulové hmotnosti stanovovaných proteinů

Tabulka 5.7 - Množství MnSOD SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii

MnSOD (arbitrární jednotky)		
	Normoxie	Hypoxie
SHR	26,45 ± 1,059	23,88 ± 0,6090
SHR-mt ^{BN}	25,64 ± 0,8694	24,03 ± 1,884

SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); MnSOD – manganová superoxiddismutáza
hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=6
arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení, za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů čtyř experimentálních skupin

Graf 5.6 - Množství MnSOD SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii



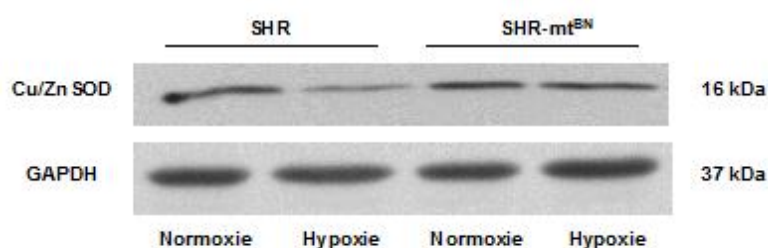
SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); MnSOD – manganová superoxiddismutáza
Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S.E.M.; n=6
arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení, za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů čtyř experimentálních skupin

5.3.1.2 Cu/ZnSOD

Na obrázku 5.2 je reprezentativní obrázek Western blotu Cu/ZnSOD. Stanovené množství Cu/ZnSOD je prezentováno v tabulce 5.8 a v grafu 5.7.

Množství proteinu Cu/ZnSOD se neliší mezi kmeny. Kmen SHR po hypoxii vykazuje signifikantní snížení hladiny Cu/ZnSOD a to na 68 %. U konplastického kmene (SHR- mt^{BN}) vidíme také klesající trend. Množství Cu/ZnSOD po hypoxii dosahuje cca 85 %, tento pokles však není statisticky významný.

Obrázek 5.2 - Reprezentativní obrázek Western blotu Cu/ZnSOD a GAPDH (kontrolní protein)



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR- mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); Cu/ZnSOD – měď-zinková superoxiddismutáza; GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

vpravo jsou uvedeny přibližné molekulové hmotnosti stanovovaných proteinů

Tabulka 5.8 - Množství Cu/ZnSOD SHR a SHR- mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii

Cu/ZnSOD (arbitrární jednotky)		
	Normoxie	Hypoxie
SHR	29,11 ± 1,611	19,91 ± 1,300 *
SHR- mt^{BN}	27,49 ± 1,750	23,49 ± 1,315

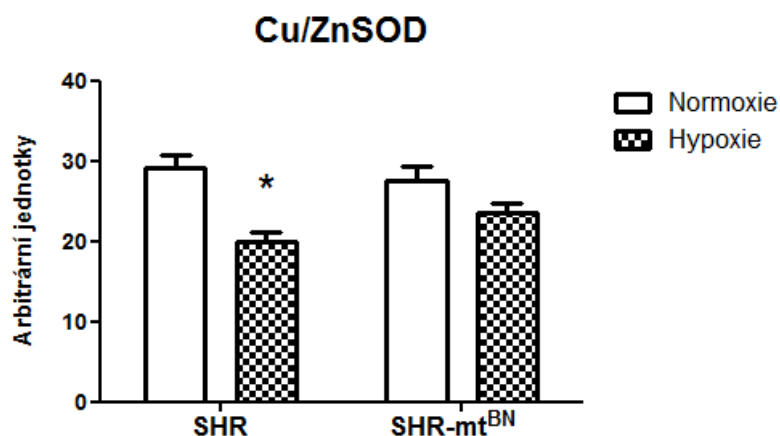
SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR- mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); Cu/ZnSOD – měď-zinková superoxiddismutáza;

hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=5

arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení, za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů čtyř experimentálních skupin

*statisticky významné rozdíly jsou označeny: * $P < 0.05$ vs. odpovídající normoxická skupina*

Graf 5.7 - Množství Cu/ZnSOD SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); Cu/ZnSOD – měď-zinková superoxiddismutáza

Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S.E.M.; n=5

arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení, za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů čtyř experimentálních skupin

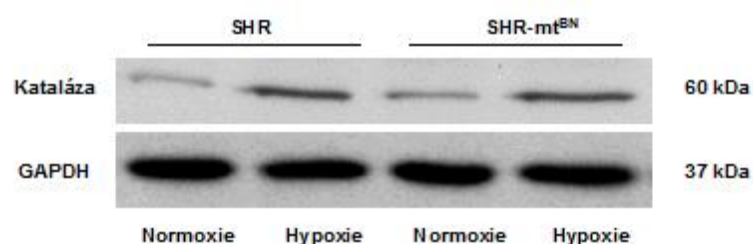
statisticky významné rozdíly jsou označeny: * $P < 0.05$ vs. odpovídající normoxická skupina

5.3.1.3 Kataláza

Na obrázku 5.3 je reprezentativní obrázek Western blotu katalázy. Stanovené množství katalázy je prezentováno v tabulce 5.9 a v grafu 5.8.

Množství katalázy narůstá po hypoxii u SHR (194 %) i u konplastického kmene (156 %) vůči kontrolám. Menší nárůst u konplastického kmene po hypoxii vede k signifikantnímu rozdílu mezi SHR a konplastickým kmenem. Po hypoxii je množství katalázy u SHR přibližně 1,12krát vyšší než u konplastického kmene.

Obrázek 5.3 - Reprezentativní obrázek Western blotu katalázy a GAPDH (kontrolní protein)



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); GAPDH – glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenáza
vpravo jsou uvedeny přibližné molekulové hmotnosti stanovených proteinů

Tabulka 5.9 - Množství katalázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii

Kataláza (arbitrární jednotky)		
	Normoxie	Hypoxie
SHR	17,38 ± 0,8559	33,7 ± 0,8031 *
SHR-mt ^{BN}	19,08 ± 0,9221	29,83 ± 0,5822 * #

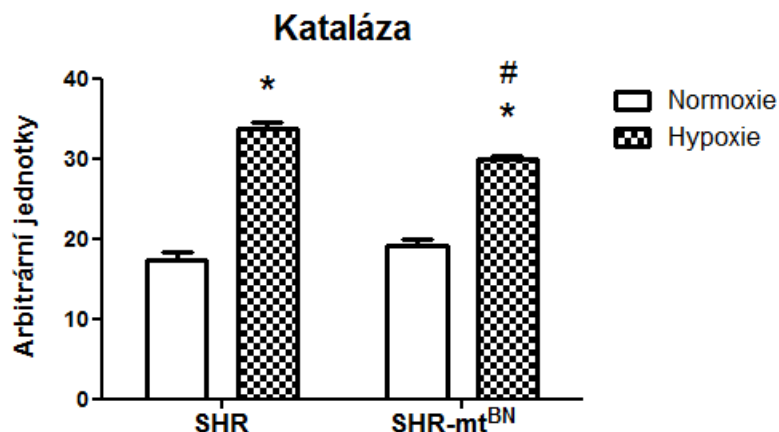
SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway)

hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=6

arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení, za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů čtyř experimentálních skupin

*statisticky významné rozdíly jsou označeny: * $P < 0.05$ vs. odpovídající normoxická skupina; # $P < 0.05$ vs. odpovídající skupina SHR*

Graf 5.8 - Množství katalázy SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway)

Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S.E.M.; n=6

arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení, za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů čtyř experimentálních skupin

statisticky významné rozdíly jsou označeny: * $P < 0.05$ vs. odpovídající normoxická skupina; # $P < 0.05$ vs. odpovídající skupina SHR

5.3.2 Enzymy oxidační fosforylace

Bylo stanoveno množství proteinu u vybraných podjednotek komplexů oxidační fosforylace. Pomocí směsi protilátek Total OXPHOS byly stanoveny jaderně kódované podjednotky Ndufa9 (komplex I), Sdha (komplex II), Uqcrc2 (komplex III), COX-4 (komplex IV) a Atp5a1 (komplex V). Dále byla použita protilátka proti MTCO1 (mitochondriálně kódovaná podjednotka komplexu IV).

Reprezentativní obrázek Western blotu podjednotek oxidační fosforylace je na obrázku 5.4. Stanovené celkové množství proteinů oxidační fosforylace je prezentováno v tabulce 5.10 a v grafu 5.9 a bylo stanoveno jako součet denzitometrických objemů odpovídajících pěti proteinům stanovovaným koktejlem protilátek Total OXPHOS. Stanovená množství jednotlivých podjednotek jsou zaznamenána v tabulce 5.11 a v grafu 5.10.

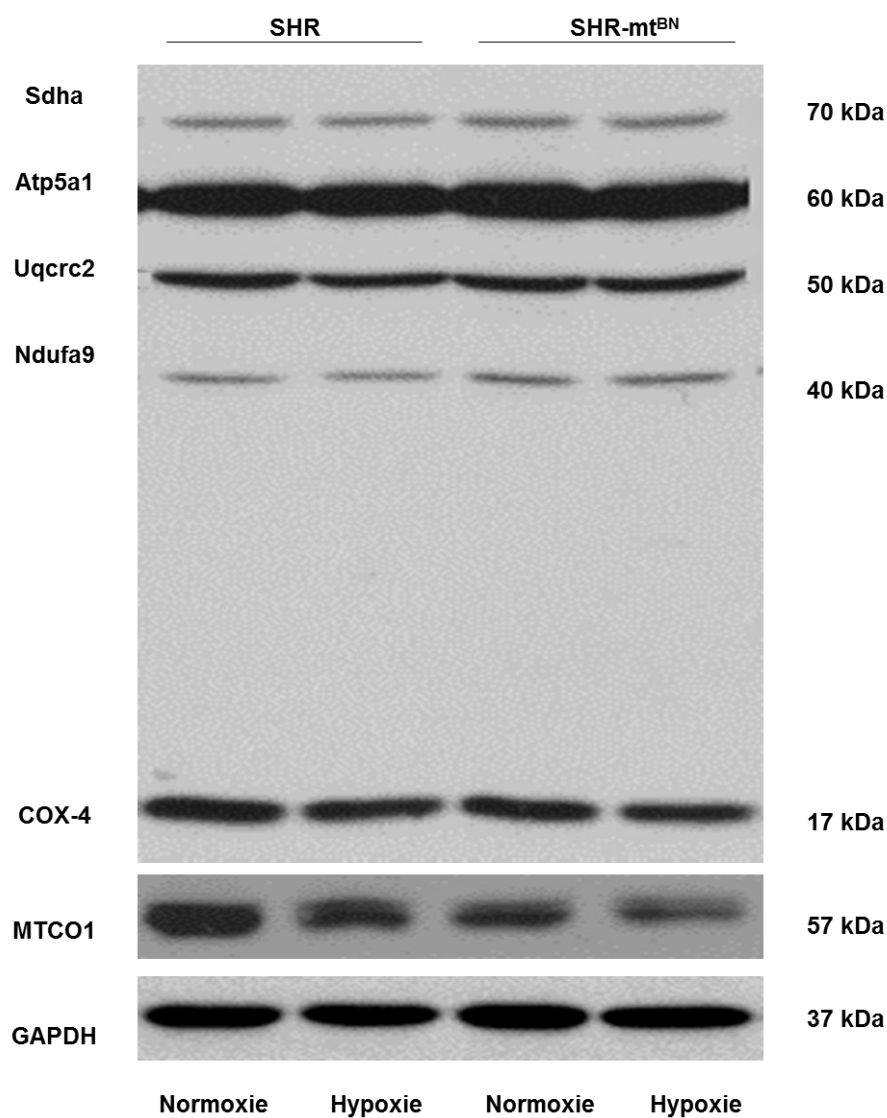
Celkové množství proteinů oxidační fosforylace se neliší mezi kmeny a klesá signifikantně u SHR kmene po adaptaci na chronickou hypoxii (93 %). Na konplastický kmen neměla adaptace na hypoxii vliv.

U podjednotek Sdha, Uqcrc2 a Atp5a1 nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi SHR a konplastickým kmenem ani žádná změna v důsledku adaptace na hypoxii. Nicméně, u podjednotek Sdha a Uqcrc2 pozorujeme u SHR klesající trend po adaptaci na hypoxii, zatímco u konplastického kmene je tendence ke zvýšení. Také podjednotka Ndufa 9 vykazuje po adaptaci na hypoxii u kmene SHR klesající trend, který u kmene konplastického není zřetelný, což vede k signifikantně vyššímu množství této podjednotky u konplastického kmene vůči SHR po adaptaci na hypoxii (1,15krát).

Obě stanovované podjednotky komplexu IV (COX-4 a MTCO1) vykazují signifikantní pokles po adaptaci na chronickou hypoxii u obou kmenů (COX-4 na 86 % u SHR a 81 % u SHR-mt^{BN}; MTCO1 na 88 % jak u SHR, tak u SHR-mt^{BN}). Množství podjednotky MTCO1 je signifikantně nižší u kmene SHR-mt^{BN} a to jak za normoxických podmínek, tak i po adaptaci na chronickou hypoxii (86 %) ve srovnání s kmenem SHR.

Množství podjednotky COX-4 je u SHR-mt^{BN} signifikantně nižší pouze po adaptaci na chronickou hypoxii (87 %) ve srovnání s SHR. Za normoxických podmínek je množství COX-4 u konplastického kmene také mírně sníženo (vůči SHR), tento rozdíl však není statisticky významný.

Obrázek 5.4 - Reprezentativní obrázek Western blotu podjednotek komplexů oxidační fosforylace a GAPDH (kontrolní protein)



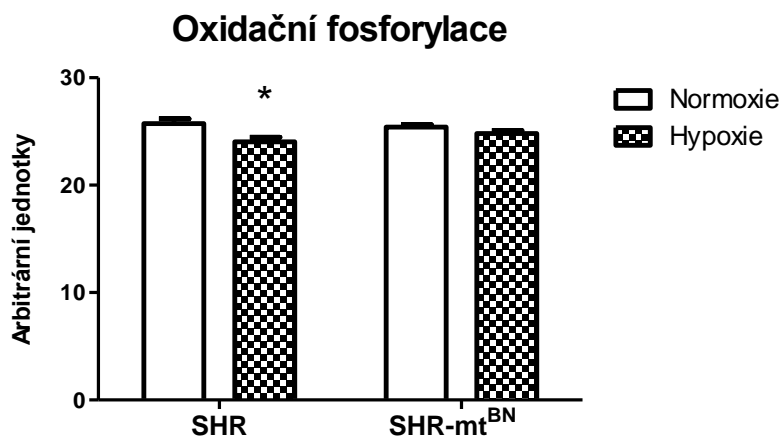
SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); Ndufa9 – podjednotka komplexu I; Sdha – podjednotka komplexu II; Uqcrc2 – podjednotka komplexu III; COX-4, MTCO1 – podjednotky komplexu IV; Atp5a1 – podjednotka komplexu V; GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
vpravo jsou uvedeny přibližné molekulové hmotnosti stanovených proteinů

Tabulka 5.10 - Součet množství proteinu komplexů oxidační fosforylace u SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii (dáno součtem množství proteinu pěti podjednotek stanovených směsí protilátek Total OXPHOS)

Total OXPHOS (arbitrární jednotky)		
	Normoxie	Hypoxie
SHR	25,74 ± 0,4399	24,05 ± 0,4193 *
SHR-mt ^{BN}	25,41 ± 0,2151	24,8 ± 0,2893

SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); Total OXPHOS – směs protilátek proti podjednotkám oxidační fosforylace hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=6
arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení, za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů čtyř experimentálních skupin
statisticky významné rozdíly jsou označeny: * P<0.05 vs. odpovídající normoxická skupina

Graf 5.9 - Součet množství proteinu komplexů oxidační fosforylace u SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii (dáno součtem množství proteinu pěti podjednotek stanovených směsí protilátek Total OXPHOS)



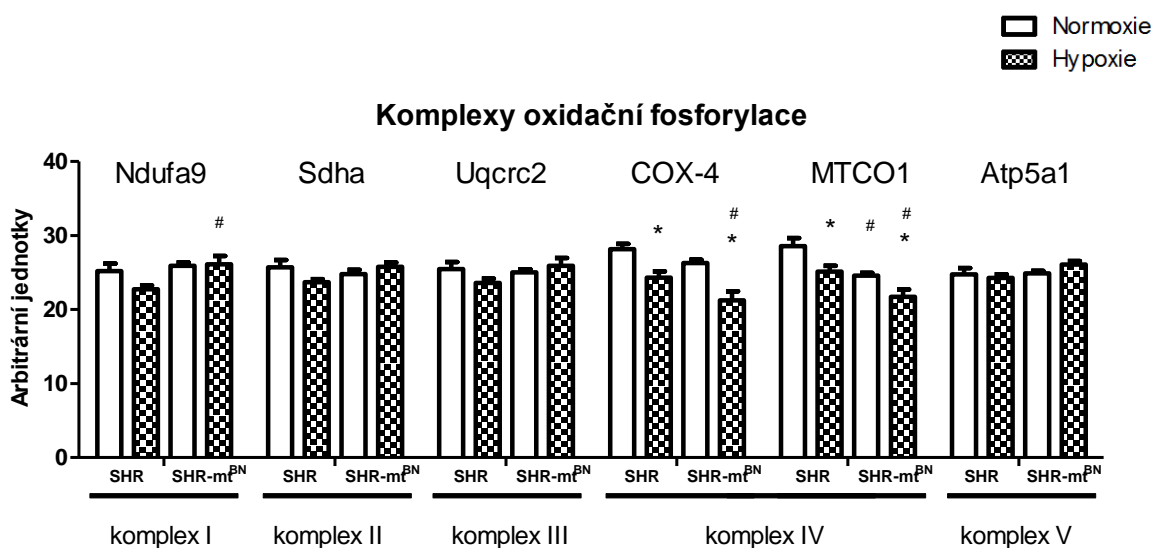
SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway)
Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S.E.M.; n=6
arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení, za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů čtyř experimentálních skupin
statisticky významné rozdíly jsou označeny: * P<0.05 vs. odpovídající normoxická skupina

Tabulka 5.11 - Množství jednotlivých podjednotek komplexů oxidační fosforylace SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii

		Komplexy oxidační fosforylace (arbitrární jednotky)		
		Normoxie	Hypoxie	
Ndufa9	SHR	25,19 ± 1,039	22,76 ± 0,4808	komplex I
	SHR-mt ^{BN}	25,92 ± 0,4296	26,13 ± 1,126 #	
Sdha	SHR	25,72 ± 0,9686	23,7 ± 0,4060	komplex II
	SHR-mt ^{BN}	24,8 ± 0,5611	25,79 ± 0,5828	
Uqcrc2	SHR	25,47 ± 0,9365	23,59 ± 0,5928	komplex III
	SHR-mt ^{BN}	25,02 ± 0,4201	25,92 ± 1,042	
COX-4	SHR	28,16 ± 0,7265	24,31 ± 0,8541 *	komplex IV
	SHR-mt ^{BN}	26,3 ± 0,4232	21,23 ± 1,251 * #	
MTCO1	SHR	28,56 ± 1,097	25,12 ± 0,8055 *	
	SHR-mt ^{BN}	24,59 ± 0,3648 #	21,73 ± 0,9673 * #	
Atp5a1	SHR	24,76 ± 0,8275	24,28 ± 0,4664	komplex V
	SHR-mt ^{BN}	24,89 ± 0,3321	26,07 ± 0,5048	

SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mt^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); Ndufa9 – podjednotka komplexu I; Sdha – podjednotka komplexu II; Uqcrc2 – podjednotka komplexu III; COX-4, MTCO1 – podjednotky komplexu IV; Atp5a1 – podjednotka komplexu V
hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± S.E.M.; n=6
arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení, za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů čtyř experimentálních skupin
statisticky významné rozdíly jsou označeny: * P<0.05 vs. odpovídající normoxická skupina; # P<0.05 vs. odpovídající skupina SHR

Graf 5.10 - Množství jednotlivých podjednotek komplexů oxidační fosforylace u SHR a SHR-mt^{BN} potkanů normoxických a adaptovaných na hypoxii



SHR – spontánně hypertenzní potkani; SHR-mi^{BN} – konplastický kmen odvozený od kmene SHR a BN (Brown Norway); Ndufa9 – podjednotka komplexu I; Sdha – podjednotka komplexu II; Uqcrc2 – podjednotka komplexu III; COX-4, MTCO1 – podjednotky komplexu IV; Atp5a1 – podjednotka komplexu V
Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S.E.M., n=6
arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení, za 100 % byl považován součet denzitometrických
objemů čtyř experimentálních skupin
*statisticky významné rozdíly jsou označeny: * P<0.05 vs. odpovídající normoxická skupina; # P<0.05 vs.*
odpovídající skupina SHR

6 Diskuse

6.1 Experimentální model a zvolený materiál

Cílem mé práce bylo stanovení vybraných parametrů u konplastického kmene potkanů (SHR-mt^{BN}) odvozeného od kmene SHR vložním mitochondrií kmene BN. Pro charakterizaci kmene SHR-mt^{BN} sloužil jako kontrola kmen SHR, od něhož je konplastický kmen odvozen. Zároveň byly obě skupiny potkanů rozděleny na normoxické kontroly a jedince adaptované na CNH.

V této studii, která měla za úkol první charakterizaci srdcí konplastického kmene SHR-mt^{BN}, byl jako materiál použit srdeční homogenát, ačkoli hlavní náplní této práce byly mitochondriální parametry. Proces izolace mitochondrií totiž vede k významným ztrátám materiálu a často také k poškození mitochondrií, zejména mitochondrie ze stresovaného svalu jsou na izolační proces značně citlivé. Přitom bylo publikováno, že měření mitochondriálních parametrů na homogenátu odpovídá výsledkům získaným na izolovaných mitochondriích a vyžaduje cca 5x menší množství tkáně (Pecinová et al., 2011). Jiná studie nicméně pozorovala změny koncentrace MnSOD po adaptaci na IHH pouze na mitochondriální frakci, zatímco na homogenátu nebyly tyto změny patrné (Balková et al., 2011). To mohlo být dáno sníženým množstvím mitochondriální hmoty, což bylo na stejném modelu potvrzeno sníženou koncentrací kardiolipinu (Ježková et al., 2002). V naší studii byla jako ukazatel mitochondriální hmoty použita aktivita CS. Aktivita CS je běžně používána jako marker mitochondriální matrix, či mitochondriální hmoty (De Sousa et al., 1999; Ekstrand et al., 2004). Jelikož nebyly v této studii naměřeny žádné rozdíly v aktivitě CS mezi experimentálními skupinami, lze předpokládat, že množství mitochondriální hmoty se neliší mezi kmeny ani v závislosti na hypoxické adaptaci.

V srdci se nacházejí dvě odlišné subpopulace mitochondrií (SSM a IFM), které se liší strukturně i biochemicky (Palmer et al., 1977). Vzhledem k tomu, že adaptace na chronickou hypoxii ovlivňuje tyto subpopulace odlišně (Heather et al., 2012), představují jednotlivé subpopulace mitochondrií zajímavý experimentální model pro další výzkum kardioprotekce u konplastického kmene.

Adaptace na chronickou hypoxii ovlivňuje různým způsobem samce a samice a získané výsledky se liší také podle věku (shrnutí v Ošťádal and Kolář, 2007). V této studii byli použiti samci potkanů staří 3 měsíce. Při studiu srdečního svalu je důležitý výběr srdečního oddílu. Adaptace na CNH má odlišné účinky na RV a na LV (Rumsey et al., 1999), proto je důležité zkoumat je odděleně. Většina studií včetně této se zabývá LV, neboť změny v RV jsou poznamenány také probíhající hypertrofií (Bohuslavová et al., 2010).

Homogenát srdečního svalu je běžně používaným experimentálním materiálem, srdeční tkáň však není tvořena pouze kardiomyocyty. Obsahuje další buněčné typy, mezi které patří fibroblasty, endoteliální buňky a buňky hladkého svalstva cév (Banerjee et al., 2007). Homogenát ze srdeční svaloviny je tedy směsí různých buněk, nicméně s výraznou převahou kardiomyocytů, které zaujímají 30 % počtu buněk a přibližně 70 % objemu srdce (shrnutí v Jugdutt, 2003).

Výsledky pokusů zkoumajících adaptaci na hypoxické podmínky se liší v závislosti na typu zvolené hypoxie, na délce hypoxického působení i na míře hypoxického stimulu. Model adaptace na chronickou hypoxii použitý v této studii je standardně používaný model CNH, jehož kardioprotektivní účinek byl potvrzen u potkanů Wistar (Borchert et al., 2011; Neckář et al., 2013). Navození kardioprotektivních účinků u kmene SHR, který se v mnohém liší od normotenzních potkanů, bylo prokázáno pro preconditioning, který u SHR potkanů snížil poškození srdečního svalu a omezil reperfuční arytmie po akutní ischemii. Snížení velikosti infarktu a omezení počtu arytmií však bylo menší než u normotenzních jedinců (Ravingerová et al., 2011). Také CNH působí protektivně na SHR potkany. Adaptace na CNH snižuje velikost infarktu i výskyt arytmií u SHR (Zajíčková, 2013).

Vzhledem k tomu, že konplastický kmen SHR-mt^{BN} se od kmene původního liší pouze mitochondriálním genomem, který kóduje některé podjednotky komplexů oxidační fosforylace, byla studie zaměřena z velké části na stanovení aktivit a množství enzymů oxidační fosforylace. Dále byly stanoveny aktivity vybraných enzymů Krebsova cyklu, který je součástí energetického metabolismu a má přímou návaznost na oxidační fosforylaci. Vzhledem k tomu, že oxidační fosforylace je hlavním místem produkce ROS, předpokládali jsme změny také v antioxidačním systému.

U vybraných enzymů byly stanoveny enzymové aktivity, přičemž je třeba zdůraznit, že stanovené aktivity odpovídají maximální aktivitě za přítomnosti nadbytku substrátu. Aktivita enzymů *in vivo* se může výrazně lišit. Množství enzymů bylo stanoveno metodou Western blotu. Jako vnitřní kontrola změn stanovovaných proteinů byl použit “housekeeping” protein GAPDH, který je běžně používán ve studiích zabývajících se CNH jako standard pro kontrolu nanášky na Western blotu i jako standard pro stanovování množství mRNA (Klusoňová et al., 2009; Neckář et al., 2013).

6.2 Hmotnostní parametry

Hmotnostní parametry se mezi kmenem SHR a konplastickým kmenem výrazně neliší. Nahrazení mitochondriálního genomu tedy nevede u kmene SHR ke změnám hmotnosti těla, která je u SHR kmene významně snížena vůči normotenzním WKY. Výměna mitochondriálního genomu nemá vliv ani na hypertrofii srdce, která je u kmene SHR spojena s hypertenzí (Charvátová et al., 2012; Jennings and Lockett, 2000).

Po adaptaci na CNH se u obou kmenů signifikantně snižuje hmotnost těla a současně se zvyšuje hmotnost RV, což poukazuje na hypertrofii. Zatímco z hmotnosti RV se zdá, že hypertrofie RV je u konplastického kmene nižší, po normalizaci hmotnosti RV vůči hmotnosti těla se tento rozdíl ztrácí, a plyne tedy pouze z mírných rozdílů v celkové velikosti potkanů. Údaje v literatuře jsou nejednotné, několik prací popisuje snížení hmotnosti těla a zároveň hypertrofii RV normotenzních potkanů a myši po adaptaci na CNH (Bohuslavová et al., 2010; Rumsey et al., 1999), zatímco jiné práce tyto změny nezaznamenaly (Heather et al., 2012; Neckář et al., 2013), což může být způsobeno rozdílnými zvířecími modely nebo mírnou modifikací protokolu adaptace. Zde prezentované výsledky jsou však v souladu s výsledky studie popisující snížení hmotnosti těla a vývoj hypertrofie RV u SHR adaptovaných na stejnou míru CNH lišící se pouze délkou hypoxického působení (Vilar et al., 2008). Hmotnosti LV po adaptaci na hypoxii mírně klesají stejně jako hmotnosti septa, tento pokles však není statisticky významný, pouze snížení hmotnosti septa u konplastického kmene dosáhlo signifikance. Poměr hmotnosti LV vůči hmotnosti těla je u adaptovaných potkanů mírně, avšak signifikantně vyšší, tato změna však vyplývá pouze z výrazného snížení hmotnosti těla po adaptaci na hypoxii.

6.3 Aktivita enzymů *Krebsova cyklu*

Aktivita CS v srdci nevykazovala žádný rozdíl mezi SHR a konplastickým kmenem stejně jako aktivita CS měřená u těchto kmenů na jaterních mitochondriích (Pravenec et al., 2007). Změny aktivity CS nebyly pozorovány ani na srdci jiného konplastického kmene SHR-mt^{LEW} (Houštěk et al., 2012).

Aktivita CS nevykazovala změny ani po adaptaci SHR a konplastického kmene na chronickou hypoxii. Jak již bylo zmíněno, je to zároveň důkazem, že se nemění množství mitochondriální hmoty. Změny aktivity ani množství CS nebyly pozorovány po CNH ani u potkanů kmene Wistar (Heather et al., 2012; Novel-Chaté et al., 1998), přičemž SHR vykazují v dospělosti aktivitu CS odpovídající kontrolním normotenzním potkanům WKY (Hickey et al., 2009). Bylo však popsáno, že množství mRNA pro CS po hypoxii významně klesá u konplastického kmene, zatímco u kmene SHR se množství mRNA nemění (Brabcová, 2013). Podobný výsledek stabilní aktivity CS za výrazných změn množství mRNA byl pozorován v srdci také v důsledku cvičení (Siu et al., 2003). Rozdíly mezi množstvím mRNA a aktivitou enzymu mohou být způsobeny regulací na posttranskripční či posttranslační úrovni a v budoucnu bude třeba stanovit také množství proteinu CS.

V aktivitě MDH nebyl naměřen rozdíl mezi SHR a konplastickým kmenem. Záměna mitochondrií tedy nemá patrně na aktivitu MDH vliv. Změny však byly pozorovány po adaptaci na hypoxii. U kmene SHR se aktivita MDH po adaptaci na hypoxii snižuje, zatímco aktivita MDH konplastického kmene se po adaptaci na hypoxii nemění. Mitochondrie kmene BN tedy ovlivnily chování kmene SHR po adaptaci na hypoxii, co se týče aktivity MDH.

Aktivita MDH byla stanovována na srdečním homogenátu a neodpovídá tedy pouze aktivitě mitochondriální MDH účastníci se *Krebsova cyklu*, ale je ovlivněna také aktivitou cytosolické a mitochondriální MDH účastníci se malát-aspartátového kyvadla. V srdci, kde je malát-aspartátové kyvadlo nejvýznamnější cestou vstupu NADH do mitochondrií, je význam cytosolické MDH značný. Aktivita MDH je v srdeční tkáni ze 75% lokalizována v mitochondriích a z 25% v cytoplazmě (Safonova et al., 2005). V budoucnu by bylo na místě změřit aktivitu tohoto enzymu na izolovaných mitochondriích a v cytosolu.

MDH je alostericky regulována koncentrací malátu a oxalacetátu a také poměrem NADH/NAD⁺. Aktivita MDH je ovlivňována také citrátem (shrnutí v Minárik et al., 2002). MDH spolu s CS a patrně řadou dalších enzymů účastnících se Krebsova cyklu tvoří komplexy, které usnadňují předání meziproductů cyklu. Konkrétně oxalacetát, který je produkován MDH, je cílen k CS, která ho využívá k další reakci. Regulace aktivity MDH *in vivo* může být tedy dána také schopností tvořit takové komplexy (Beeckmans and Kanarek, 1981).

Aktivita MDH byla stanovena spektrofotometricky *in vitro* jako maximální aktivita s nadbytkem substrátu. Rychlost reakce je navíc stanovována v opačném směru, kde substrátem je oxalacetát, který je v rámci Krebsova cyklu produktem reakce MDH. Takové stanovení neodpovídá situaci *in vivo*, neboť není ovlivněno fyziologickými regulacemi, jakými je buněčná koncentrace substrátů a produktů či sestavování komplexů. Naměřené změny maximální aktivity po adaptaci na hypoxii jsou tedy pravděpodobně dány změnou množství MDH, či změnou v aktivitě v důsledku posttranslačních modifikací.

Pokles aktivity MDH u SHR kmene odpovídá pozorovanému poklesu aktivity MDH v srdci albino potkanů vystavených ischemii. Změna v aktivitě po ischemii byla dána významným zvýšením Michaelisovy konstanty K_m , což vyjadřuje pokles afinity enzymu k substrátu (Safonova et al., 2005). Dále bylo popsáno, že po adaptaci na CNH se snižuje průchod malát-aspartátovým kyvadlem (roste množství aspartátu) u potkanů Sprague-Dawley (Rumsey et al., 1999). Zajímavé je, že inhibice malát-aspartátového kyvadla během ischemie a počátku reperfúze vede k omezení infarktu a moduluje metabolismus glukózy stejně jako u ischemického preconditioningu (Støttrup et al., 2010).

Bylo publikováno několik prací zabývajících se vlivem oxidačního stresu na aktivitu MDH. Jak aktivita, tak i množství mRNA mitochondriální MDH v buňkách mozku je zvýšena oxidačním stresem (Shi and Gibson, 2011). Zatímco přímý vliv H₂O₂ na aktivitu MDH nebyl prokázán (Nulton-Persson and Szweda, 2001; Tretter and Adam-Vizi, 2000), redoxní stav glutathionu (poměr GSH/GSSG) koreluje se změnami aktivity cytoplazmatické MDH v srdci během srdeční zástavy (Safonova et al., 2005). To je pravděpodobně dáno tím, že MDH může být vystavena S-glutathionylaci, což je posttranslační modifikace cysteinového zbytku proteinu glutathionem. S-glutathionylace ovlivňuje aktivitu MDH a dochází k ní v srdci např. během IRI (Eaton and Shattock, 2002).

Vzhledem k významným rozdílům v množství antioxidantních enzymů mezi kmeny SHR a SHR-mt^{BN} po adaptaci na hypoxii je možné, že změny maximální aktivity MDH v této studii souvisí s redoxním stavem. U konplastického kmene nebyl pozorován významný pokles Cu/ZnSOD jako je tomu u kmene SHR. Množství katalázy se zvyšovalo po hypoxii u obou kmenů, u konplastického kmene bylo však toto zvýšení signifikantně menší. Zatímco množství Cu/ZnSOD, která produkuje H₂O₂ je u konplastického kmene vyšší, množství katalázy, která H₂O₂ spotřebovává je u konplastického kmene nižší. To by mohlo vést ke zvýšené hladině H₂O₂, který může být kromě katalázy odstraňován také GPx za současné oxidace glutathionu. Vzhledem k vlivu stavu glutathionu v buňce na aktivitu MDH by bylo v budoucnu vhodné stanovit množství glutathionu a poměr GSH/GSSG, což by mohlo pomoci objasnit pozorované změny v aktivitě MDH. Objasnění těchto změn by usnadnilo také stanovení množství proteinu MDH.

6.4 Antioxidační enzymy

Bylo stanoveno množství MnSOD, Cu/ZnSOD a katalázy jako důležitých enzymů účastnících se antioxidační ochrany buněk. Množství GPx, která hraje v antioxidační ochraně buňky také významnou roli, stanoveno nebylo, neboť zatímco množství detekovaného proteinu koreluje u MnSOD, Cu/ZnSOD a katalázy většinou dobře s jejich enzymatickou aktivitou, GPx vyžaduje specifický kofaktor glutathion, a účinnost enzymu je tedy výrazně ovlivněna redoxním stavem a množstvím glutathionu v buňce (shrnutí v Harris, 1992).

V srdci se ve srovnání s játry vyskytuje menší množství katalázy (2%) (Lai et al., 1995), nicméně specifické umístění katalázy v srdečních buňkách v mitochondriální matrix, tedy v blízkosti hlavního zdroje ROS, kterým je ETC, může mít vliv na její účinnost (Radi et al., 1991). Kataláza má sice nižší afinitu k H₂O₂ než GPx, nabývá však pravděpodobně na významu za stresových podmínek, neboť umožňuje odstraňovat H₂O₂ nezávisle na glutathionu (Cohen and Hochstein, 1963).

V množství proteinu MnSOD nebyly pozorovány rozdíly mezi kmeny ani změny po adaptaci na hypoxii. U SHR po hypoxii MnSOD mírně klesá, tento pokles však není statisticky významný. Změny v množství MnSOD nebyly pozorovány ani na úrovni mRNA (Brabcová, 2013).

Množství Cu/ZnSOD se neliší mezi kmeny. Po hypoxii dochází u kmene SHR k výraznému poklesu množství Cu/ZnSOD. U konplastického kmene je pozorován mírný, nesignifikanční pokles. Tento pokles by mohl vyplývat ze zvýšené degradace Cu/ZnSOD, bylo totiž popsáno, že Cu/ZnSOD může být nevratně inaktivována pomocí H_2O_2 a následně degradována, což je adaptační mechanismus bránící další akumulaci H_2O_2 , potenciálního producenta vysoce nebezpečného hydroxylového radikálu (Csonka et al., 2000; Salo et al., 1990). Co se týče množství mRNA Cu/ZnSOD, po hypoxii byl pozorován také pokles. Tento pokles dosáhl statistické významnosti u obou kmenů (Brabcová, 2013), a je tedy pravděpodobné, že ke snížení množství proteinu přispívá snížená exprese genu pro Cu/ZnSOD. Toho by se mohly účastnit některé z mnoha transkripčních faktorů regulujících expresi Cu/ZnSOD, z nichž nejvýznamnější jsou NF κ -B a AP1, které jsou stimulovány oxidačním stresem a jejich aktivace byla popsána v důsledku adaptace na chronickou hypoxii (shrnutí v Essop, 2007; Miao and St Clair, 2009; Touyz, 2004). Zvýšené množství AP-1 může vést ke snížení exprese Cu/ZnSOD (Baldelli et al., 2008).

Cu/ZnSOD zodpovídá cca za 26% celkové aktivity SOD v myším srdci a pozorovaný mírný pokles v množství Cu/ZnSOD tak neovlivní významně celkovou aktivitu SOD za předpokladu, že se množství MnSOD, které odpovídá 75% aktivity SOD, nemění (Grankvist et al., 1981). Tento výsledek však naznačuje významnější změny oxidačního stavu v cytosolu než v mitochondriální matrix, neboť Cu/ZnSOD se vyskytuje v cytosolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Nicméně bylo popsáno, že také za cytosolickou produkci H_2O_2 jsou v srdci z 92% zodpovědné mitochondrie (shrnutí v Boveris and Cadenas, 2000).

Koncentrace katalázy se neliší mezi kmeny za normoxických podmínek. Po adaptaci na chronickou hypoxii dochází u obou kmenů k výraznému nárůstu množství katalázy. Tento nárůst je však u konplastického kmene mírnější a vede k signifikantně nižší koncentraci katalázy po adaptaci na hypoxii u konplastického kmene vůči SHR. Oproti tomu hladina mRNA roste pouze u kmene konplastického, u SHR nebyl zaznamenán nárůst (Brabcová, 2013). Rozpory ve změnách množství proteinu a mRNA mohou být dány změnami v rychlosti degradace katalázy. Bylo totiž popsáno, že za nízké hladiny ROS je kataláza fosforylována, což vede ke zvýšení její aktivity, za vysoké hladiny ROS je však kataláza v závislosti na fosforylačním stavu ubiquitována a degradována v 26S proteazomu (Cao et al., 2003).

U myši došlo po adaptaci na CNH k nárůstu množství Cu/ZnSOD, katalázy a Prx (Viganò et al., 2011). U potkanů Wistar byla pozorována po adaptaci na CNH zvýšená hladina MnSOD, zatímco množství Cu/ZnSOD zůstalo stejné (Neckář et al., 2013). Potkani SHR se však od normotenzních kontrolních potkanů v množství antioxidantních enzymů výrazně liší a není tedy překvapivé, že u nich byly pozorovány rozdílné změny antioxidantního systému v reakci na hypoxickou adaptaci (Csonka et al., 2000; Gómez-Amores et al., 2006).

Změny v množství stanovených antioxidantních enzymů v naší studii odpovídají výsledkům experimentu, při kterém byla srdce potkanů SHR vystavena H_2O_2 . Při zvýšené koncentraci H_2O_2 došlo k poklesu celkového množství a aktivity SOD, k čemuž přispěl patrně zejména pokles Cu/ZnSOD, exprese MnSOD klesla mírně. Došlo k výrazné indukci katalázy, výrazně vzrostla jak její exprese, tak i aktivita. Hladina GPx zůstala vysoká. Stejně změny byly pozorovány po vystavení IRI (Csonka et al., 2000). Podobné výsledky byly získány při studiu srdečního selhání u lidí, kdy nebyly popsány změny aktivity a exprese MnSOD, Cu/ZnSOD, GPx v srdci, zatímco exprese, aktivita i množství katalázy vzrostlo cca 2x (Dieterich et al., 2000). Zdá se tedy, že pozorované rozdíly v množství antioxidantních enzymů souvisejí s mírou oxidačního stresu. Jedním z možných vysvětlení jsou pozorované změny množství mRNA monoaminoxidázy A, jejíž hladina je signifikantně nižší u konplastického kmene vůči SHR a výrazně roste u obou kmenů po adaptaci na hypoxii (Brabcová, 2013). Monoaminoxidáza je enzym produkující peroxid vodíku, změny v jejím množství by tedy mohly vést ke změnám produkce ROS, které by mohly mít za následek pozorované změny antioxidantních enzymů. Nicméně pro objasnění těchto změn je potřeba stanovit produkci ROS.

6.5 Oxidační fosforylace

Aktivity NADH-cytochrom c oxidoreduktázy a sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy nevykazovaly žádný rozdíl mezi SHR a konplastickým kmenem, což odpovídá výsledkům měřeným na jaterních mitochondriích (Pravenec et al., 2007). Tyto výsledky jsou v souladu se stanoveným množstvím proteinu, neboť obsah podjednotek Ndufa9 (komplex I), Sdha (komplex II) a Uqcrc2 (komplex III) se neliší mezi kmenem SHR a konplastickým kmenem za normoxických podmínek. Na vzorcích jater byl popsán signifikantně vyšší obsah

podjednotky Ndufa9 u konplastického kmene vůči SHR, což může být dáno tkáňovou specifikou (Pravenec et al., 2007).

Po adaptaci na chronickou hypoxii nebyla zaznamenána žádná změna v aktivitách NADH-cytochrom c oxidoreduktázy a sukcinát-cytochrom c oxidoreduktázy. Také množství proteinu se po hypoxii významně neměnilo u podjednotek Sdha (komplex II) a Uqcrc2 (komplex III). Množství podjednotky Ndufa9 (komplex I) po hypoxii u kmene SHR mírně klesá (nesignifikantně), zatímco u konplastického kmene adaptace na hypoxii množství Ndufa9 neovlivnila. Pokles množství podjednotky Ndufa9 byl popsán také v reakci na ischemické působení (30 minut) na srdci morčat (Gadicherla et al., 2012). Jak již bylo řečeno, pokles v naší studii nedosáhl statistické významnosti, nicméně vede k signifikantně vyššímu množství Ndufa9 u konplastického kmene vůči SHR po adaptaci na chronickou hypoxii. Vzhledem k tomu, že komplex I je jedním z míst produkce ROS, je rozdíl v množství Ndufa9 mezi studovanými kmeny po hypoxii zajímavý a jak již bylo zmíněno, je nutné dále stanovit také produkci ROS v srdečních buňkách jednotlivých experimentálních skupin.

Aktivita COX v srdci nevykazovala rozdíl mezi SHR a konplastickým kmenem, zatímco Pravenec et al. (2007) zjistili významně nižší aktivitu COX u konplastického kmene v játerních mitochondriích. Nicméně aktivity enzymů včetně COX se mezi tkáněmi výrazně liší (Barazzoni et al., 2000). Studie konplastického kmene SHR-mt^{LEW} dokazuje, že rozdíl mezi konplastickým kmenem a původním kmenem se může lišit v závislosti na studované tkáni (Houštěk et al., 2012).

Co se týče podjednotek COX (komplex IV), byl stanoven významně nižší obsah MTCO1 u konplastického kmene vůči SHR. MTCO1 je podjednotka kódovaná mtDNA a je produktem jednoho ze sedmi protein-kódujících genů, které se liší mezi SHR a konplastickým kmenem. Také v játrech byla pozorována nižší hladina MTCO1 podjednotky u konplastického kmene vůči SHR, avšak tento rozdíl nebyl statisticky významný (Pravenec et al., 2007). Konplastický kmen vykazuje také mírně nižší množství podjednotky COX-4, což by mohlo souviset s nižším množstvím podjednotky MTCO1, neboť pro sestavení funkčního komplexu jsou potřeba všechny podjednotky v přesném poměru a bylo popsáno, že nepřítomnost jedné podjednotky ovlivní množství proteinu ostatních podjednotek či dokonce některých podjednotek jiných komplexů (Diaz et al., 2006). Rozdíl v množství podjednotky COX-4 nicméně nebyl statisticky významný.

Po adaptaci na chronickou hypoxii klesá mírně aktivita COX u SHR i u konplastického kmene. Tento pokles však není statisticky významný. Množství obou stanovovaných podjednotek komplexu IV (MTCO1 a COX-4) se po adaptaci na chronickou hypoxii snižuje u obou kmenů. Těmto výsledkům odpovídá pokles mRNA podjednotky COX-4-1 u kmene SHR i konplastického kmene a zároveň pokles mRNA COX-4-2 po adaptaci u konplastického kmene (Brabcová, 2013). Obsah MTCO1 je po hypoxii opět signifikantně nižší u konplastického kmene vůči SHR. Množství COX-4 je po adaptaci na chronickou hypoxii také signifikantně nižší u konplastického kmene vůči SHR. Menší pokles v aktivitě doprovázející významný pokles v množství podjednotek komplexu IV odpovídá zachování či mírnému zvýšení aktivity v přepočtu na množství komplexů.

Množství podjednotky Atp5a1 (komplex V) se významně nelišilo mezi kmeny ani mezi adaptovanými a neadaptovanými zvířaty. Aktivitu komplexu V se nepodařilo změřit, neboť při spektrofotometrickém stanovení na homogenátu interferuje s aktivitou komplexu V velké množství přítomných buněčných ATPáz a aktivita komplexu V na pozadí aktivit těchto enzymů není měřitelná.

Významné změny se tedy podařilo nalézt pouze na úrovni komplexu IV, ostatní komplexy systému oxidační fosforylace nemění svou aktivitu ani obsah. Tyto výsledky jsou v souladu s představou, že komplex IV je rychlost limitujícím enzymem respiračního řetězce a centrem regulace oxidační fosforylace a produkce ROS. Aktivita COX je významně regulována transmembránovým protonovým gradientem a poměrem ATP/ADP. Podjednotka IV je klíčová regulační podjednotka, která existuje ve 2 izoformách. Izoforma COX-4-1 je exprimována ve všech savčích tkáních, zatímco izoforma COX-4-2 se uplatňuje zejména v embryonálním vývoji, v neuronech a plicní tkáni (shrnuto v Arnold, 2012). V savčích buňkách byla po adaptaci na hypoxii popsána výměna podjednotky COX-4-1 za podjednotku COX-4-2, k čemuž dochází na základě aktivace HIF-1. Výměna podjednotek byla pozorována v játerní a plicní tkáni, avšak nikoli v srdci (Fukuda et al., 2007; Heather et al., 2012). Protilátka použitá v této práci rozeznává jak izoformu 1, tak i izoformu 2 této molekuly. Pravenec et al. (2007), kteří měřili množství COX-4-1 na játerních mitochondriích, sledovali signifikantně nižší množství tohoto proteinu u konplastického kmene vůči SHR, oproti tomu množství mRNA COX-4-1 v srdeční tkáni je u obou kmenů stejné (Brabcová, 2013).

U potkanů Wistar byl po adaptaci na CNH popsán pokles v aktivitě COX u SSM, zatímco množství proteinu se významně neměnilo (Heather et al., 2012). Nicméně bylo popsáno, že osmnáctiměsíční SHR potkani mají významně nižší aktivitu COX ve srovnání s WKY, zatímco množství podjednotek bylo shodné či vyšší. Tento rozdíl však může být dán také srdečním selháním, ke kterému u potkanů SHR v tomto věku dochází (Jüllig et al., 2008).

Pozorované změny v aktivitě a množství podjednotek komplexu IV svědčí o posttranslační regulaci genové exprese. Alosterickým modulátorem komplexu IV je ATP, přičemž tato regulace je ovlivněna posttranslačními modifikacemi (defosforylace), přítomností izoformy COX-4-2, která není k regulaci ATP citlivá, a thyroïdními hormony. Stanovení aktivity COX prostřednictvím respirace s TMPD a askorbátem však neumožňuje měřit alosterickou inhibici pomocí ATP a aktivity naměřené *in vitro* tedy neodpovídají enzymovým aktivitám *in vivo* (shrnutí v Arnold, 2012).

Změny v aktivitě komplexů oxidační fosforylace mohou vést ke změnám produkce ROS. Studium buněčných kultur ukázalo, že hypoxie zvyšuje produkci ROS v ETC, což dále vede k aktivaci HIF-1 transkripčního faktoru, který spouští odpověď na hypoxii (Chandel et al., 1998). Stanovení rychlosti produkce ROS u těchto potkanů tedy umožní zodpovědět další otázky.

7 Závěr

Konplastický kmen se za normoxických podmínek liší od kmene SHR pouze v množství proteinu podjednotky MTCO1 komplexu IV oxidační fosforylace. Jedná se o produkt jednoho z mitochondriálních genů, jejichž sekvence se mezi kmeny SHR a BN liší.

Po adaptaci na chronickou hypoxii byly mezi kmeny pozorovány významné rozdíly. Ze získaných výsledků tedy vyplývá, že výměna mitochondriálního genomu ovlivňuje citlivost srdce na hypoxickou zátěž.

Získané výsledky ukazují, že konplastické kmeny mohou představovat perspektivní model pro studium poruch metabolismu za různých patologických stavů. Výhodou tohoto modelu je, že se výměna mitochondriálního genomu manifestuje na celém organismu, proto lze srovnávat vliv zátěže na úrovni různých orgánů.

8 Shrnutí

- **SHR-mt^{BN} vs. SHR za normoxických podmínek:**

nižší množství proteinu MTCO1 (mitochondriálně kódovaná podjednotka komplexu IV)

- **SHR – vliv adaptace na hypoxii:**

snížení hmotnosti těla

hypertrofie RV

pokles aktivity MDH

pokles množství proteinu Cu/ZnSOD

zvýšení množství proteinu katalázy

snížení celkového množství proteinu komplexů oxidační fosforylace

snížení množství podjednotek COX-4 a MTCO1 komplexu IV

- **SHR-mt^{BN} - vliv adaptace na hypoxii:**

snížení hmotnosti těla

hypertrofie RV

snížení hmotnosti septa

zvýšení množství proteinu katalázy

snížení množství proteinu podjednotek COX-4 a MTCO1 komplexu IV

- **SHR-mt^{BN} vs. SHR po adaptaci na hypoxii:**

nižší hmotnost RV

vyšší poměr hmotnost LV/hmotnost těla

vyšší aktivita MDH

nižší množství proteinu katalázy

vyšší množství proteinu podjednotky Ndufa9 komplexu I

nižší množství proteinu podjednotek COX-4 a MTCO1 komplexu IV

9 Seznam použité literatury

- Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C. 2006. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27, 639-645.
- Aitman, T. J., Glazier, A. M., Wallace, C. A., Cooper, L. D., Norsworthy, P. J., Wahid, F. N., Al-Majali, K. M., Trembling, P. M., Mann, C. J., Shoulders, C. C., Graf, D., St Lezin, E., Kurtz, T. W., Kren, V., Pravenec, M., Ibrahimi, A., Abumrad N. A., Stanton, L. W. & Scott J. 1999. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nature Genetics*, 21, 76-83.
- Al Rawi, S., Louvet-Vallee, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R. & Galy, V. 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*, 334, 1144-1147.
- Amri, H. & Abu-Asab M. S. 2011. The Physiology of Qi. In: Energy Medicine East and West, edited by Mayor D., Micozzi M. S., Churchill Livingstone/Elsevier, Edinburgh, 141–150.
- Aragonés, J., Fraisl, P., Baes, M. & Carmeliet, P. 2009. Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metabolism*, 9, 11-22.
- Arnold, S. 2012. The power of life-Cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion*, 12, 46-56.
- Atanur, S. S., Birol, I., Guryev, V., Hirst, M., Hummel, O., Morrissey, C., Behmoaras, J., Fernandez-Suarez, X. M., Johnson, M. D., McLaren, W. M., Patone, G., Petretto, E., Plessy, C., Rockland, K. S., Rockland, C., Saar, K., Zhao, Y., Carninci, P., Flicek, P., Kurtz T., Cuppen, E., Pravenec, M., Hubner, N., Jones, S. J. M., Birney E. & Aitman, T. J. 2010. The genome sequence of the spontaneously hypertensive rat: Analysis and functional significance. *Genome Research*, 20, 791-803.
- Baker, J. E., Konorev, E. A., Gross, G. J., Chilian, W. M. & Jacob, H. J. 2000. Resistance to myocardial ischemia in five rat strains: is there a genetic component of cardioprotection? *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 278, H1395-H1400.
- Baldelli, S., Aquilano, K., Rotilio, G. & Ciriolo, M. R. 2008. Glutathione and copper, zinc superoxide dismutase are modulated by overexpression of neuronal nitric oxide synthase. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, 2660-2670.
- Balková, P., Hlaváčková, M., Milerová, M., Neckář, J., Kolář, F., Novák, F. & Nováková, O. 2011. N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts. *Physiological Research*, 60, 467-474.

- Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K. & Baudino, T. A. 2007. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293, H1883-H1891.
- Barazzoni, R., Short, K. R. & Nair, K. S. 2000. Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 3343-3347.
- Barrientos, A., Fontanesi, F., Díaz, F. 2009. Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Current Protocols in Human Genetics*, 63, 19.3.1–19.3.14
- Beeckmans, S. & Kanarek, L. 1981. Demonstration of physical interactions between consecutive enzymes of the citric-acid cycle and of the aspartate-malate shuttle – A study involving fumarase, malate-dehydrogenase, citrate synthase and aspartate-aminotransferase. *European Journal of Biochemistry*, 117, 527-535.
- Behringer, R. 1998. Supersonic congenics? *Nature Genetics*, 18, 108-108.
- Bešík, J., Szárszoi, O., Kuneš, J., Netuka, I., Malý, J., Kolář, F., Pirk, J. & Ošťádal, B. 2007. Tolerance to acute ischemia in adult male and female spontaneously hypertensive rats. *Physiological Research*, 56, 267-274.
- Bianciardi, P., Fantacci, M., Caretti, A., Ronchi, R., Milano, G., Morel, S., von Segesser, L., Corno, A. & Samaja, M. 2006. Chronic in vivo hypoxia in various organs: Hypoxia-inducible factor-1 alpha and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 875-880.
- Bio-Rad, Mini-PROTEAN® 3 Cell Instruction Manual, Bio-Rad Laboratories, Inc.
- Blier, P. U., Dufresne, F. & Burton, R. S. 2001. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends in Genetics*, 17, 400-406.
- Blok, R. B., Gook, D. A., Thorburn, D. R. & Dahl, H. H. M. 1997. Skewed segregation of the mtDNA nt 8993 (T->G) mutation in human oocytes. *American Journal of Human Genetics*, 60, 1495-1501.
- Bohuslavová, R., Kolář, F., Kuthanová, L., Neckář, J., Tichopád, A. & Pavlinkova, G. 2010. Gene expression profiling of sex differences in HIF1-dependent adaptive cardiac responses to chronic hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 109, 1195-1202.
- Borchert, G. H., Yang, C. T. & Kolář, F. 2011. Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 300, H507-H513.
- Boveris, A. & Cadenas, E. 2000. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *Iubmb Life*, 50, 245-250.

- Brabcová I. 2013. Úloha mitochondriálního genomu v ischemicko-reperfúzním poškození srdce u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) adaptovaných na hypoxii. Diplomová práce v tisku; Praha: Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta. Katedra genetiky a mikrobiologie.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Burger, D., Xenocostas, A. & Feng, Q. P. 2009. Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin. *Current Molecular Pharmacology*, 2(1), 56-69.
- Cabassi, A., Dancelli, S., Pattoneri, P., Trabassi, G., Quartieri, F., Moschini, L., Cavazzini, S., Maestri, R., Lagrasta, C., Graiani, G., Corradi, D., Parenti, E., Tedeschi, S., Cremaschi, E., Coghi, P., Vinci, S., Fiaccadori, E. & Borghetti, A. 2007. Characterization of myocardial hypertrophy in prehypertensive spontaneously hypertensive rats: interaction between adrenergic and nitrosative pathways. *Journal of Hypertension*, 25, 1719-1730.
- Cao, C., Leng, Y. M., Liu, X., Yi, Y. P., Li, P. & Kufe, D. 2003. Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *Biochemistry*, 42, 10348-10353.
- Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C. & Schumacker, P. T. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 11715-11720.
- Charvátová, Z., Ošťádalová, I., Zicha, J., Kuneš, J., Maxová, H. & Ošťádal, B. 2012. Cardiac tolerance to ischemia in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Physiological Research*, 61, S145-S153.
- Chen, A. F., Chen, D. D., Daiber, A., Faraci, F. M., Li, H. G., Rembold, C. M. & Laher, I. 2012. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clinical Science*, 123, 73-91.
- Chen, C. F., Chien, C. T., Fang, H. S. & Chiu, I. S. 1991. Effects of atrial-natriuretic-factor in chronic hypoxic spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 18, 355-359.
- Christe, M. E. & Rodgers, R. L. 1994. Altered glucose and fatty-acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 26, 1371-1375.
- Churchill, P. C., Churchill, M. C., Bidani, A. K., Griffin, K. A., Picken, M., Pravenec, M., Kren, V., StLezin, E., Wang, J. M., Wang, N. & Kurtz, T. W. 1997. Genetic susceptibility to hypertension-induced renal damage in the rat - Evidence based on kidney-specific genome transfer. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 1373-1382.
- Cohen, G. & Hochstein, P. 1963. Glutathione peroxidase – Primary agent for elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, 2, 1420-1428.

- Conrad, C. H., Brooks, W. W., Hayes, J. A., Sen, S., Robinson, K. G. & Bing, O. H. L. 1995. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart-failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*, 91, 161-170.
- Cowley, A. W. 2006. The genetic dissection of essential hypertension. *Nature Reviews Genetics*, 7, 829-840.
- Csonka, C., Pataki, T., Kovacs, P., Müller, S. L., Schroeter, M. L., Tosaki, A. & Blasig, I. E. 2000. Effects of oxidative stress on the expression of antioxidative defense enzymes in spontaneously hypertensive rat hearts. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 612-619.
- Day, B. J. 2009. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochemical Pharmacology*, 77, 285-296.
- De Sousa, E., Veksler, V., Minajeva, A., Kaasik, A., Mateo, P., Mayoux, E., Hoerter, J., Bigard, X., Serrurier, B. & Ventura-Clapier, R. 1999. Subcellular creatine kinase alterations - Implications in heart failure. *Circulation Research*, 85, 68-76.
- Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S. & Moraes, C. T. 2006. Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 4872-4881.
- Dieterich, S., Bieligk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G. & Prestle, J. 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart - Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, 101, 33-39.
- Eaton, P. & Shattock, M. J. 2002. Purification of proteins susceptible to oxidation at cysteine residues: Identification of malate dehydrogenase as a target for S-glutathiolation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973, 529-532.
- Eckle, T., Köhler, D., Lehmann, R., El Kasmi, K. C. & Eltzschig, H. K. 2008. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection - A new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation*, 118, 166-175.
- Ekstrand, M. I., Falkenberg, M., Rantanen, A., Park, C. B., Gaspari, M., Hultenby, K., Rustin, P., Gustafsson, C. M. & Larsson, N. G. 2004. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Human Molecular Genetics*, 13, 935-944.
- Essop, M. F. 2007. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *Journal of Physiology-London*, 584, 715-726.
- Fukuda, R., Zhang, H. F., Kim, J. W., Shimoda, L., Dang, C. V. & Semenza, G. L. 2007. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, 129, 111-122.
- Gadicherla, A. K., Stowe, D. F., Antholine, W. E., Yang, M. Y. & Camara, A. K. S. 2012. Damage to mitochondrial complex I during cardiac ischemia reperfusion injury is reduced indirectly by anti-anginal drug ranolazine. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1817, 419-429.

- GE Healthcare, Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system, Product Booklet
- Gómez-Amores, L., Mate, A., Revilla, E., Santa-María, C. & Vázquez, C. M. 2006. Antioxidant activity of propionyl-L-carnitine in liver and heart of spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 78, 1945-1952.
- Grankvist, K., Marklund, S. L. & Täljedal, I. B. 1981. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione-peroxidase in pancreatic-islets and other tissues in the mouse. *Biochemical Journal*, 199, 393-398.
- Grivennikova, V. G., Kareyeva, A. V. & Vinogradov, A. D. 2010. What are the sources of hydrogen peroxide production by heart mitochondria? *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1797, 939-944.
- Hajri, T., Ibrahimi, A., Coburn, C. T., Knapp, F. F., Kurtz, T., Pravenec, M. & Abumrad, N. A. 2001. Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 23661-23666.
- Hansford, R. G., Hogue, B. A. & Mildaziene, V. 1997. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29, 89-95.
- Harman, D. 2006. Free radical theory of aging: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1), 10-21.
- Harris, E. D. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb Journal*, 6, 2675-2683.
- Heather, L. C., Cole, M. A., Tan, J. J., Ambrose, L. J. A., Pope, S., Abd-Jamil, A. H., Carter, E. E., Dodd, M. S., Yeoh, K. K., Schofield, C. J. & Clarke, K. 2012. Metabolic adaptation to chronic hypoxia in cardiac mitochondria. *Basic Research in Cardiology*, 107(3), 1-12.
- Hickey, A. J. R., Chai, C. C., Choong, S. Y., Costa, S. D., Skea, G. L., Phillips, A. R. J. & Cooper, G. J. S. 2009. Impaired ATP turnover and ADP supply depress cardiac mitochondrial respiration and elevate superoxide in nonfailing spontaneously hypertensive rat hearts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 297, C766-C774.
- Hlaváčková, M., Kožichová, K., Neckář, J., Kolář, F., Musters, R. J. P., Novák, F. & Nováková, O. 2010. Up-regulation and redistribution of protein kinase C-delta in chronically hypoxic heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345, 271-282.
- Houštěk, J., Hejzlarová, K., Vrbacký, M., Drahota, Z., Landa, V., Zídek, V., Mlejnek, P., Šimáková, M., Šilhavý, J., Mikšík, I., Kazdová, L., Oliyarnyk, O., Kurtz, T. & Pravenec, M. 2012. Nonsynonymous variants in mt-Nd2, mt-Nd4, and mt-Nd5 are linked to effects on oxidative phosphorylation and insulin sensitivity in rat conplastic strains. *Physiological Genomics*, 44, 487-494.

- Hubner, N., Yagil, C. & Yagil, Y. 2006. Novel integrative approaches to the identification of candidate genes in hypertension. *Hypertension*, 47, 1-5.
- Hurtado, A. 1960. Some clinical aspects of life at high altitudes. *Annals of Internal Medicine*, 53, 247-258.
- Jafri, M. S., Dudycha, S. J. & O'Rourke, B. 2001. Cardiac energy metabolism: Models of cellular respiration. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3, 57-81.
- Jennings, D. B. & Lockett, H. J. 2000. Angiotensin stimulates respiration in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 278, R1125-R1133.
- Ježková, J., Nováková, O., Kolář, F., Tvrzická, E., Neckář, J. & Novák, F. 2002. Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 232, 49-56.
- Joyeux-Faure, M., Stanke-Labesque, F., Lefebvre, B., Béguin, P., Godin-Ribuot, D., Ribuo, C., Launois, S. H., Bessard, G. & Lévy, P. 2005. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *Journal of Applied Physiology*, 98, 1691-1696.
- Jugdutt, B. I. 2003. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix - When is enough enough? *Circulation*, 108, 1395-1403.
- Jüllig, M., Hickey, A. J. R., Chai, C. C., Skea, G. L., Middleditch, M. J., Costa, S., Choong, S. Y., Philips, A. R. J. & Cooper, G. J. S. 2008. Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats. *Proteomics*, 8, 2556-2572.
- Klevstig, M. J., Markova, I., Burianova, J., Kazdova, L., Pravenec, M., Novakova, O. & Novak, F. 2011. Role of FAT/CD36 in novel PKC isoform activation in heart of spontaneously hypertensive rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 357, 163-169.
- Klusoňová, P., Řeháková, L., Borchert, G., Vagnerová, K., Neckář, J., Ergang, P., Mikšík, I., Kolář, F. & Pácha, J. 2009. Chronic intermittent hypoxia induces 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat heart. *Endocrinology*, 150, 4270-4277.
- Kolář, F., Ježková, J., Balková, P., Břeh, J., Neckář, J., Novák, F., Nováková, O., Tomášová, H., Srbová, M., Ošťádal, B., Wilhelm, J. & Herget, J. 2007. Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292, H224-H230.
- Kolář, F. & Ošťádal, B. 2004. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiological Research*, 53, S3-S13.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. & Starkov, A. A. 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *Febs Letters*, 416, 15-18.

- Lai, C. C., Huang, W. H., Askari, A., Klevay, L. M. & Chiu, T. H. 1995. Expression of glutathione-peroxidase and catalase in copper-deficient rat-liver and heart. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 6, 256-262.
- Logan, D. C. 2006. The mitochondrial compartment. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1225-1243.
- Longo, N. 2003. Mitochondrial encephalopathy. *Neurologic Clinics*, 21, 817-831.
- Lukyanenko, V., Chikando, A. & Lederer, W. J. 2009. Mitochondria in cardiomyocyte Ca²⁺ signaling. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 1957-1971.
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C. & De Castro, I. N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595-603.
- Meng, C., Jin, X., Xia, L., Shen, S. M., Wang, X. L., Cai, J., Chen, G. Q., Wang, L. S. & Fang, N. Y. 2009. Alterations of mitochondrial enzymes contribute to cardiac hypertrophy before hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Proteome Research*, 8, 2463-2475.
- Miao, L. & St Clair, D. K. 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47, 344-356.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. & Remacle, J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell-survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17, 235-248.
- Minárik, P., Tomášková, N., Kollárová, M. & Antalík, M. 2002. Malate dehydrogenases - Structure and function. *General Physiology and Biophysics*, 21, 257-265.
- Mráček, T., Pecinová, A., Vrbacký, M., Drahota, Z. & Houštěk, J. 2009. High efficiency of ROS production by glycerophosphate dehydrogenase in mammalian mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 481, 30-36.
- Mruk, D.D., Cheng, C.Y. 2011. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis*, 1(2), 121-122.
- Murry, C. E., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. 1986. Preconditioning with ischemia - A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74, 1124-1136.
- Navarro, J. C., Kunas, R. C., Sampaolo, S. & Mansmann, U. 1999. Heart mitochondria in rats submitted to chronic hypoxia. *Histology and Histopathology*, 14, 1045-1052.
- Neckář, J., Borchert, G. H., Hloušková, P., Mičová, P., Nováková, O., Novák, F., Hroch, M., Papoušek, F. & Kolář, F. 2013. Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels. *Current pharmaceutical design*. Epub, in press

- Neckář, J., Ošťádal, B. & Kolář, F. 2004. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiological Research*, 53, 621-628.
- Neckář, J., Papoušek, F., Nováková, O., Ošťádal, B. & Kolář, F. 2002. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Research in Cardiology*, 97, 161-167.
- Nohl, H. & Hegner, D. 1978. Evidence for existence of catalase in matrix space of rat-heart mitochondria. *Febs Letters*, 89, 126-130.
- Nouette-Gaulain, K., Malgat, M., Rocher, C., Savineau, J. P., Marthan, R., Mazat, J. P. & Sztark, F. 2005. Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovascular Research*, 66, 132-140.
- Novel-Chaté, V., Mateo, P., Saks, V. A., Hoerter, J. A. & Rossi, A. 1998. Chronic exposure of rats to hypoxic environment alters the mechanism of energy transfer in myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30, 1295-1303.
- Nulton-Persson, A. C. & Szweda, L. I. 2001. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 23357-23361.
- Okamoto, K., & Aoki, K. 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*, 27(3), 282-293.
- Ošťádal, B. & Kolář, F. 2007. Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: Beneficial and adverse effects. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 158, 224-236.
- Palmer, J. W., Tandler, B. & Hoppel, C. L. 1977. Biochemical properties of subsarcolemmal and inter-fibrillar mitochondria isolated from rat cardiac-muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 252, 8731-8739.
- Payne, R. M. 2011. The heart in Friedreich's Ataxia: Basic findings and clinical implications. *Progress in pediatric cardiology*, 31(2), 103-109.
- Pearce, S., Nezich, C. L., & Spinazzola, A. 2012. Mitochondrial diseases: Translation matters. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2013; 55, 1-12, Epub 2012
- Pecinová, A., Drahota, Z., Nůsková, H., Pecina, P. & Houštěk, J. 2011. Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion*, 11, 722-728.
- Postnov, Y. V., Orlov, S. N., Budnikov, Y. Y., Doroschuk, A. D., & Postnov, A. Y. 2007. Mitochondrial energy conversion disturbance with decrease in ATP production as a source of systemic arterial hypertension. *Pathophysiology*, 14(3), 195-204.

- Pravenec, M., Hyakukoku, M., Houstek, J., Zidek, V., Landa, V., Mlejnek, P., Miksik, I., Dudová-Mothejzíkova, K., Pecina, P., Vrbacký, M., Drahota, Z., Vojtiskova, A., Mracek, T., Kazdova, L., Oliyarnyk, O., Wang, J. M., Ho C., Qi, N., Sugimoto, K. & Kurtz, T. 2007. Direct linkage of mitochondrial genome variation to risk factors for type 2 diabetes in conplastic strains. *Genome Research*, 17, 1319-1326.
- Pravenec, M., Zidek, V., Simakova, M., Kren, V., Krenova, D., Horky, K., Jachymova, M., Mikova, B., Kazdova, L., Aitman, T. J., Churchill, P. C., Webb, R. C., Hingarh, N. H., Yang, Y., Wang, J. M., St Lezin, E. M. & Kurz, T. W. 1999. Genetics of Cd36 and the clustering of multiple cardiovascular risk factors in spontaneous hypertension. *Journal of Clinical Investigation*, 103, 1651-1657.
- Radi, R., Turens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D. & Freeman, B. A. 1991. Detection of catalase in rat-heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 22028-22034.
- Ravingerová, T., Bernátová, I., Matejíková, J., Ledvényiová, V., Nemčková, M., Pecháňová, O., Tribulová, N. & Slezák, J. 2011. Impaired cardiac ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rats is attenuated by adaptation to chronic and acute stress. *Experimental & Clinical Cardiology*, 16, E23-E29.
- Reaven, G. M. & Chang, H. 1991. Relationship between blood-pressure, plasma-insulin and triglyceride concentration, and insulin action in spontaneous hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *American Journal of Hypertension*, 4, 34-38.
- Rumsey, W. L., Abbott, B., Bertelsen, D., Mallamaci, M., Hagan, K., Nelson, D. & Erecinska, M. 1999. Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 276, H71-H80.
- Safer, B. 1975. Metabolic significance of malate-aspartate cycle in heart. *Circulation Research*, 37, 527-533.
- Safonova, O. A., Popova, T. N., Artyukhov, V. G. & Matasova, L. V. 2005. Function of cytoplasmic NAD-dependent malate dehydrogenase from rat myocardium under conditions of ischemia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 140, 25-28.
- Salo, D. C., Pacifici, R. E., Lin, S. W., Giulivi, C. & Davies, K. J. A. 1990. Superoxide-dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 11919-11927.
- Schreibelt, G., Van Horssen, J., Van Rossum, S., Dijkstra, C. D., Drukarch, B. & de Vries, H. E. 2007. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Research Reviews*, 56, 322-330.
- Schwartz, L. M., Sebbag, L., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. 2001. Duration and reinstatement of myocardial protection against infarction by ischemic preconditioning in open chest dogs. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33, 1561-1570.

- Semenza, G. L. 2011. Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1813, 1263-1268.
- Shi, Q. L. & Gibson, G. E. 2011. Up-regulation of the mitochondrial malate dehydrogenase by oxidative stress is mediated by miR-743a. *Journal of Neurochemistry*, 118, 440-448.
- Shi, Y., Hutchins, W., Ogawa, H., Chang, C. C., Pritchard, K. A., Zhang, C. Y., Khampang, P., Lazar, J., Jacob, H. J., Rafiee, P. & Baker, J. E. 2005. Increased resistance to myocardial ischemia in the Brown Norway vs. Dahl S rat: role of nitric oxide synthase and Hsp90. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 38, 625-635.
- Silver, L. M. 1995. Laboratory mice. In: Mouse genetics: concepts and applications. Oxford University Press, New York (Adapted for the Web by Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor)
- Siu, P. M., Donley, D. A., Bryner, R. W. & Alway, S. E. 2003. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *Journal of Applied Physiology*, 94, 555-560.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L. & DiMauro, S. 2001. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nature Reviews Genetics*, 2, 342-352.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. & Brand, M. D. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 44784-44790.
- Stanley, W. C., Recchia, F. A. & Lopaschuk, G. D. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological Reviews*, 85, 1093-1129.
- Støttrup, N. B., Løfgren, B., Birkler, R. D., Nielsen, J. M., Wang, L. X., Caldarone, C. A., Kristiansen, S. B., Contractor, H., Johannsen, M., Bøtker, H. E. & Nielsen, T. T. 2010. Inhibition of the malate-aspartate shuttle by pre-ischaemic aminooxyacetate loading of the heart induces cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 88, 257-266.
- Thorpe, G.H.G., Kricka, L.J., Moseley, S.B., Whitehead, T.P. 1985. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: Application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clinical Chemistry*, 31(8), 1335-1341.
- Touyz, R. M. 2004. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension - What is the clinical significance? *Hypertension*, 44, 248-252.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets – Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4354.

- Tretter, L. & Adam-Vizi, V. 2000. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *Journal of Neuroscience*, 20, 8972-8979.
- Turrens, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology-London*, 552, 335-344.
- Venardos, K. M. & Kaye, D. M. 2007. Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: A review. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1539-1549.
- Viganò, A., Vasso, M., Caretti, A., Bravatà, V., Terraneo, L., Fania, C., Capitanio, D., Samaja, M. & Gelfi, C. 2011. Protein modulation in mouse heart under acute and chronic hypoxia. *Proteomics*, 11, 4202-4217.
- Vilar, J., Waeckel, L., Bonnin, P., Cochain, C., Loinard, C., Duriez, M., Silvestre, J. S. & Lévy, B. I. 2008. Chronic hypoxia-induced angiogenesis normalizes blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research*, 103, 761-769.
- Winge, D. R. 2012. Sealing the Mitochondrial Respirasome. *Molecular and Cellular Biology*, 32, 2647-2652.
- Zajíčková P. 2013. Vliv chronické hypoxie na ischemickou toleranci srdce u spontánně hypertenzních potkanů. Diplomová práce v tisku; Praha: Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta. Katedra fyziologie
- Zelko, I. N., Mariani, T. J. & Folz, R. J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 337-349.
- Zhu, W. Z., Xie, Y., Chen, L., Yang, H. T. & Zhou, Z. N. 2006. Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 40, 96-106.